

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Problem Image Mailbox.**

93243153

B04 D16 S03

IS. N. MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

LIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)



BA

J04 2

Classification internationale des brevets 5 :
C07K 15/14, C12P 21/08
C12N 5/20, G01N 33/577
A61K 37/02, 39/395

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 93/14125

(43) Date de publication internationale: 22 juillet 1993 (22.07.93)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00025

(22) Date de dépôt international: 13 janvier 1993 (13.01.93)

(30) Données relatives à la priorité:
92/00255 13 janvier 1992 (13.01.92) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]: 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs: et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOUMSELL, Laurence [FR/FR]: 3, rue Arago, F-92800 Puteaux (FR).
BENSUSSAN, Armand [FR/FR]: 11, rue du Cap, F-94000 Créteil (FR).

(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques: Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NOVEL LYMPHOCYTIC ANTIGEN, CORRESPONDING ANTIBODY AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre: NOUVEL ANTIGENE LYMPHOCYTAIRE, ANTICORPS CORRESPONDANT ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

Antigenic protein consisting of a 150 ± 10 kDa glycoprotein determined by electrophoresis of the SDS-PAGE type in reducing conditions, expressed on the surface of T-cell lymphocytes in human blood. The present invention also concerns the protein in its dimeric form having a disulphide bond and a molecular weight of 300 ± 20 kDa. The invention further relates to antibodies directed against a protein of the invention, hybridoma lineages and the diagnostic and therapeutic application of proteins and antibodies according to the invention.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une protéine antigénique consistant en une glycoprotéine de 150 ± 10 kDa déterminée par électrophorèse de type SDS-PAGE dans des conditions réductrices, exprimée à la surface des lymphocytes T de sang humain. La présente invention concerne également la protéine sous forme dimérique à liaison disulfure de poids moléculaire 300 ± 20 kDa. La présente invention concerne enfin des anticorps dirigés contre une protéine selon l'invention, ainsi que des lignées d'hybridomes, ainsi que l'application des protéines et anticorps selon l'invention dans le domaine du diagnostic et thérapeutique.

NEW PHOSPHORYLATED GLYCOPROTEIN ANTIGEN OF T-LYMPHOCYTES IS EXPRESSED STRONGLY IN ACTIVATED CELLS, AND ANTIBODIES AND HYBRIDOMAS, FOR DETECTING PRECOCIOUS T-CELL ACTIVATION AND TREATING INFLAMMATION ETC.

DL

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Autriche | FR | France | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | GN | Guinée | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | PT | Portugal |
| BR | Brésil | IT | Italie | RO | Roumanie |
| CA | Canada | JP | Japon | RU | Fédération de Russie |
| CF | République Centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SK | République slovaque |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SN | Sénégal |
| CM | Cameroon | LK | Sri Lanka | SU | Union soviétique |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| DK | Danemark | MI | Mali | US | Etats-Unis d'Amérique |
| ES | Espagne | MN | Mongolie | VN | Viet Nam |
| FI | Finlande | | | | |

NOUVEL ANTIGENE LYMPHOCYTAIRE, ANTICORPS CORRESPONDANT ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne un nouvel antigène lymphocytaire ainsi que des anticorps correspondant à cet antigène et leurs applications.

L'activation lymphocytaire induit ou augmente l'expression de plusieurs structures de surface, dont certaines, telles que les récepteurs à l'IL2 et à la transferrine, sont directement impliquées dans la croissance cellulaire. En particulier, l'activation de lymphocytes humains conduit à des modifications phénotypiques apparaissant soit immédiatement soit à des temps variables après la perturbation des structures de reconnaissance de l'antigène. Des changements phénotypiques peuvent être attribués à l'expression à la surface de la cellule de molécules inductibles telles que CD25(1,2) et CD71(3), ou à l'expression accrue d'antigènes de surface tels que CD26(4,5), CD 29(6,7), CD45RO(8,9), ou à une modulation épitopique comme dans le cas de CD2(10,11), ou à des changements de l'affinité comme on l'a rapporté pour les molécules CD11a/CD18(12) et LAM1(13). Il n'est pas surprenant que ces molécules inductibles incluent des sous-unités de récepteurs de grande affinité pour diverses cytokines (2). Le plus souvent, elles sont détectées en utilisant un anticorps monoclonal (Acm) reconnaissant un récepteur putatif d'un ligand inconnu. Par exemple, les ligands de CD5(14,15), CD43(16) et CD69(17,18) ont été très récemment identifiés, alors que l'utilisation d'Acm en tant qu'agonistes contre ces structures avait permis d'identifier leur rôle crucial dans l'activation de la cellule T (15, 17, 18, 19). On a montré que ces Acm augmentent la concentration cytoplasmique en calcium libre, si on en fait un "cross linkage" à la surface des cellules T (19). Comme une augmentation du calcium cytosolique et une activation de la Protéine Kinase C (PKC) simultanées sont des événements précoces et essentiels de la prolifération des lymphocytes T, on a mené des investigations sur les effets de ces divers Acm sur l'activation des lymphocytes T humains en présence de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate), qui est un activateur de la PKC(20).

En outre, l'utilisation d'Acm a confirmé qu'un grand nombre d'antigènes de surface des leucocytes et en particulier ceux induits pendant l'activation sont communs aux lignées cellulaires B et T(2,3,14).

Afin d'identifier de nouvelles structures caractéristiques des lymphocytes activés, on a, selon l'invention, défini des anticorps monoclonaux contre des clones de cellules T humaines fonctionnellement définies.

Selon la présente invention, on a tout d'abord isolé un anticorps monoclonal dénommé BB18 reconnaissant, sur la surface cellulaire, un nouvel antigène lymphocytaire composé de sous-unités de 150 \pm 10 kDa, dont l'expression sur les lymphocytes T augmente rapidement après leur activation par divers stimuli notamment des lectines. En revanche, en présence de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), l'expression à la surface de la cellule de cette structure de 150 \pm 10 kDa subit une modulation négative encore plus précoce que les molécules du CD3. Des études biochimiques ainsi qu'une analyse phénotypique ont révélé que cette structure est différente de toutes les molécules identifiées précédemment sur la surface cellulaire des lymphocytes.

D'autres anticorps monoclonaux (BD16, BM4, BM71 et BM63), obtenus selon l'invention, reconnaissent la même structure de surface que l'Acm BB18. Ces anticorps sont des IgG1 qui ont été obtenues après immunisation de souris Balb/c avec un clone thymique humain et fusion avec la lignée cellulaire NS1. Ils immunoprécipitent de la surface de lymphocytes du sang périphérique humain ou de clones T radio-marqués à l'iode, la même structure moléculaire. Ces anticorps réagissent avec des épitopes différents de cette structure. Ainsi, il n'y pas d'inhibition de la fixation de l'anticorps BB18 en présence d'un excès de l'anticorps BD16 et vice-versa.

La présente invention a donc tout d'abord pour objet une protéine antigénique consistant en une glycoprotéine phosphorylée de poids moléculaire de 150 \pm 10 kDa déterminé par électrophorèse de type SDS PAGE dans des conditions réductrices, protéine exprimée à la surface des lymphocytes T humains de préférence activés.

La présente invention a aussi pour objet une protéine antigénique consistant en la même glycoprotéine phosphorylée mais sous forme d'un dimère à liaison disulfure de poids moléculaire de 300 ± 20 kDa déterminé par électrophorèse de type SDS PAGE dans des conditions non réductrices, protéine exprimée à la surface de lymphocytes T humains de préférence activés, composée de sous-unités de 150 ± 10 kDa telles que définies ci-dessus.

L'invention a également pour objet des dérivés de la protéine sous forme monomère ou dimère caractérisés en ce que la protéine se présente sous forme non glycosylée et/ou non phosphorylée ou en ce qu'elle comporte des glycosylations ou phosphorylations non naturelles ou consistant en un fragment de cette protéine comportant les sites antigéniques essentiels de la protéine ou des dérivés non glycosylés et/ou non phosphorylés et/ou comportant des glycosylations et/ou phosphorylations non naturelles.

La présente invention concerne également les anticorps monoclonaux reconnaissant un épitope d'une protéine selon l'invention, notamment les anticorps monoclonaux BD16, BB18, BM4, BM71 et BM63, ainsi que des lignées de cellules d'hybridomes produisant ces anticorps, notamment les lignées déposées à l'ECACC sous les numéros 92010801 pour l'anticorps BD16, 92010802 pour l'anticorps BB18, 93 011201 pour l'anticorps BM4, 93 011202 pour BM71 et 93 011203 pour BM63.

La protéine, ses fragments ou dérivés selon l'invention peuvent être obtenus à partir de la protéine naturelle elle-même obtenue par purification à partir de cellules productrices par des techniques d'immunoprécipitation, notamment avec les anticorps BB18, BD16, BM4, BM71 et BM63 ou d'autres techniques. La protéine selon l'invention, ses fragments et dérivés selon l'invention peuvent cependant également être obtenus par des techniques d'ADN recombinant de génie génétique à partir de l'ADN codant pour la dite protéine incorporé dans des vecteurs d'expression de celle-ci dans des cellules eukaryotes ou prokaryotes, auquel cas la glycosylation de la protéine recombinante obtenue peut différer de la protéine naturelle comme il est connu de l'homme de l'art.

35

Une protéine ou un anticorps selon l'invention peuvent être marqués par un marqueur détectable en vue de leur dosage in vitro ou leur localisation in vivo ou ex-vivo.

L'invention concerne en effet également l'utilisation des protéines et anticorps selon l'invention pour le diagnostic d'états pathologiques ou le suivi du traitement d'affection ou comme voyant d'apparition de ces affections. En particulier, la présente invention concerne l'utilisation de ces protéines et anticorps pour le diagnostic rapide d'un état d'activation précoce des cellules T lymphocytaires.

Enfin, la présente invention concerne l'emploi d'une protéine, anticorps ou fragment d'anticorps selon l'invention à titre de médicament notamment pour le traitement de maladies avec des signes de déficit immunitaire ou de pathologie inflammatoire ou auto-immunes et dans le traitement in vivo ou ex vivo de proliférations lymphoïdes malignes.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description qui va suivre.

Sur les figures annexées,

- la Figure 1 représente la cinétique d'expression à la surface cellulaire de la structure reconnue par BB18 après activation des PBMC (cellules mononuclées de sang périphérique) à l'aide de PHA. Les cellules mononucléaires du sang périphérique ont été marquées avant (D0), 3 jours (D3), ou 9 jours (D9) après la coculture avec le PHA 1 µg/ml, pour immunofluorescence indirecte avec BB18, CD25"BC96" ou un anticorps monoclonal négatif IgG1. Les profils de fluorescence sont figurés comme des histogrammes.
- La Figure 2 représente le PMA induisant une décroissance précoce de la réactivité avec BB18. Des cellules T du sang périphérique ont été incubées avec du PMA 1 µg/ml pendant 6, 10, 24 ou 144 h. Les cellules ont été lavées et traitées pour l'immunofluorescence indirecte avec des anticorps monoclonaux variés. A chaque temps de mesure, un contrôle négatif fait de cellules incubées dans les mêmes conditions mais sans PMA a été réalisé. Comme on n'a pas observé de modifications des cellules-contrôles, le contrôle testé après 6h de culture est présenté. Les profils de fluorescence sont figurés comme des histogrammes.
- La Figure 3 représente le profil de SDS-PAGE d'un immunoprécipité BB18 obtenu à partir d'un lysat de cellules T clonées. Le clone immunisant B12 de cellules T de thymus humain a été marqué en surface et lysé dans du

NP40 1%. Les immunoprécipités obtenus avec BB18, CD18" M232" ou un anticorps monoclonal IgG1 irrelevant ont été analysés sur un gel de SDS-PAGE à 7,5% dans des conditions non réductrices. Les positions des marqueurs de masse moléculaire ont été indiquées à gauche en kDa.

- 5 - La Figure 4 représente l'analyse sur gel à deux dimensions (non réducteur/réducteur) d'un immunoprécipité BB18 obtenu à partir de lysats de cellules T clonées. Les immunoprécipités obtenus avec l'anticorps monoclonal BB18 ont été d'abord séparés dans des conditions non réductrices (N. Réd.) sur un gel à 7,5% à l'aide d'un système PHAST. 10 Ensuite la bande de gel contenant l'immunoprécipité a été coupée et soumise à l'électrophorèse dans la seconde dimension, comme recommandé par le fabricant, après réduction (Réd.) sur un gel de SDS-PAGE à 7,5%. Les positions des marqueurs de masse moléculaire ont été indiquées à droite en kDa.

- 15 - La Figure 5 représente la cinétique de la prolifération des PBMC induite par l'anticorps monoclonal BB18. Des cellules mononucléaires du sang périphérique ont été incubées avec le CD3" X3" purifié 5 µg/ml (triangles blancs), l'anticorps monoclonal BB18 purifié 5 µg/ml (carrés vides) ou 10 µg/ml (cercles blancs) en présence de PMA 0,2 ng/ml pendant 2 à 8 20 jours. L'incorporation de (³H)TdR a été mesurée en "pulsant" la culture pendant les 16 dernières heures. Les résultats sont exprimés comme la moyenne d'échantillons tripliqués et le SEM a toujours été inférieur à 10% de la moyenne. Dans ces conditions, le PMA seul n'a induit de prolifération significative à aucun des temps de mesure.

- 25 - La Figure 6 représente l'autoradiographie de SDS-PAGE à 8,5% d'immunoprécipités de BB18 et BD16 en conditions réductrices, et traités ou ayant subi un traitement simulé à l'endo-F. Les positions des marqueurs de masse moléculaire sont indiquées à droite en kilodaltons.

- La Figure 7 représente l'autoradiographie de SDS-PAGE à 12% 30 d'immunoprécipités de BB18 et de BD16 en conditions réductrices, et traités ou ayant subi un traitement simulé avec la protéase V8 directement dans le gel. Les positions des marqueurs de masse moléculaire sont indiquées à droite en kilodaltons.

- La Figure 8 représente la comodulation de la structure de surface 35 cellulaire PBL à 37°C pendant 8 heures, avec un excès d'Acm BB18

ou 24 heures avec l'Acm BD16. Ensuite, on a soigneusement lavé et marqué les cellules avec un Acm biotinylé ou une Ig anti-souris de chèvre marquée au FITC, comme témoin.

- La Figure 9 représente une expérience de liaison compétitive entre les Acm BB18 et BD16. Le second anticorps (2nd mAb) était biotinylé, comme cela est indiqué dans la section "Matériel et méthodes", et sa liaison a été révélée par streptavidine-phycoérythrine.
- La Figure 10 représente l'analyse par SDS-PAGE d'immunoprécipités de BB18 et BD16 obtenus à partir d'un marquage métabolique au ^{32}P de cellules T clonées. On a analysé les immunoprécipités dans des conditions non-réductrices (partie de gauche) et dans des conditions réductrices (partie de droite). Les positions des marqueurs de masse moléculaire sont indiquées à gauche en kilodaltons.
- La Figure 11 représente l'analyse par SDS-PAGE d'immunoprécipités de BB18 et BD16 obtenus à partir d'un marquage métabolique au ^{32}P (partie de gauche) ou de marquage en surface à l' ^{125}I (partie de droite) de cellules T clonées. On a analysé les immunoprécipités dans des conditions non-réductrices des deux côtés. Les positions des marqueurs de masse moléculaire sont indiquées à droite en kilodaltons. De plus, on a utilisé un Acm CD18 comme témoin.
- La Figure 12 représente l'effet des Acm BB18 (courbe a) et BD16 (courbe b) sur la concentration intracellulaire en Ca^{2+} des cellules de Jurkat. Les flèches indiquent la nature et le temps en plus de l'Acm. Chaque trace est représentative d'au moins trois expériences. L'axe des Y représente la concentration intracellulaire en Ca^{2+} en nM, tandis que l'axe des X correspond au temps en secondes.
- La Figure 13 représente la cinétique des réponses prolifératives des PBL à une paire CD2 d'Acm (CD2X11 + D66) en présence ou en l'absence d'Acm BB18 ou BD 16. On a utilisé des Acm BB18 ou BD16, solubles et purifiés, avec une concentration finale de 5 $\mu\text{g/ml}$.

En revanche, l'incubation de PBMC avec du PMA induit une modulation négative rapide suivie d'une réexpression complète dans les 24 heures. Cette molécule n'est pas spécifique de la cellule T car elle est aussi exprimée dans des lignées cellulaires B EBV-transformées. De plus, les
5 cellules prolifèrent quand ce dimère a été stimulé en présence de concentrations submitogéniques de PMA.

I. MATERIEL ET METHODES

1. Anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux utilisés tels que CD1"L404", CD2"X11", CD2"D66", CD2"GT2", CD3"OKT3", CD4"O516", CD8"L533", CD8"OKT8", CD18"M232" et CD25"BC96" ont été soit produits localement
15 (23) soit achetés dans le commerce. Les anticorps monoclonaux BB18 et BD16 ont été préparés par immunisation de souris Balb/c avec le clone thymique B12, CD4⁺CD8⁺(22) (trois injections intraveineuses avec 20×10^6 cellules). On a fusionné des cellules de rate de souris immunisées à la lignée cellulaire NS1 cinq jours après la dernière injection. Le criblage
20 initial par immunofluorescence indirecte et cytométrie de flux en utilisant un Facstar (Becton Dickinson, Mountain View, CA) a retenu tous les surnageants d'hybridomes réagissants avec les cellules immunisantes mais pas ou faiblement avec les cellules mononucléaires du sang périphérique au repos. Les cultures contenant les anticorps monoclonaux susmentionnés ont
25 été clonées deux fois par dilution limitante. On a effectué des passages en série de l'hybridome cloné par injection i.p. dans des souris Balb/c sensibilisées avec du pristane. Les fluides des ascites ont été collectés, ultracentrifugés et purifiés par affinité, au besoin, sur une colonne de protéine A-Sépharose.

2. Isolation de populations cellulaires.

Des PBMC humaines ont été préparées par centrifugation par gradient de densité Ficoll-Isopaque. La population non-fractionnée a été séparée en populations E rosette-moins (E^-) et E rosette-plus (E^+) par
5 interaction avec 5% de globule rouge de mouton (SRBC). Le mélange a été déposé sur du Ficoll-Isopaque et les cellules E^- ont été récupérées à partir de l'interface tandis que les cellules E^+ ont été obtenues à partir du culot après lyse hypotonique du SRBC.

Les monocytes ont été obtenus à partir des cellules E^- par
10 adhérence au verre pendant une nuit. Les cellules mononucléaires du sang périphérique CD2 + CD3 ont été obtenues par lyse sous dépendance du complément avec un Acm CD3 dans la fraction cellulaire E^+ . Des échantillons normaux et leucémiques ont été obtenus à partir de la Banque
15 du Sang de l'Hôpital Saint-Louis et cryopréservés comme décrit précédemment (23).

3. Cultures cellulaires.

Des clones de cellules T humaines ont été obtenues comme décrit ailleurs (22) et mises en culture dans du milieu RPMI-1640 (GIBCO, Paisley, Ecosse) contenant 2mmol/litre de L-glutamine, de la pénicilline
20 (100 U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml), 10% de sérum humain inactivé par la chaleur et de l'interleukine 2 recombinante, gracieusement fournie par Roussel-Uclaf (Romainville, France) (30 U/ml.) Les cellules clonées ont été restimulées tous les 7 jours avec des cellules nourricières en présence de PHA purifié (Wellcome, Beckenham, UK) à 1 µg/ml et d'interleukine 2
25 recombinante. Les cellules nourricières étaient un mélange de LSP allogéniques irradiées provenant de trois donneurs (les mêmes donneurs étant utilisés pendant plusieurs mois). Les cultures de lignées cellulaires humaines leucémiques ou B EBV-transformées et de lignées cellulaires d'hybridome étaient libres de mycoplasme et maintenues en croissance
30 logarithmiques dans du RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal sélectionné inactivé à la chaleur et des antibiotiques.

4. Etudes par immunofluorescence.

Des études par immunofluorescence indirecte ont été
35 pratiquées en utilisant une Ig antisouris conjuguée à de l'isothiocyanate de

fluorescéine (FITC) ou de la phycoérythrine (PE) des Laboratoires Meloy (Springfield, VA) comme décrit précédemment (22). La fluorescence a été lue en utilisant un microfluoromètre Facstar (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

5 Pour des expériences de blocage croisé, on a d'abord incubé les cellules avec un excès d'un premier Acm pendant 30 min., puis on les a centrifugées et incubées avec la dilution appropriée d'un Acm biotinylé. Des témoins comprenaient une incubation pendant la première étape avec le même Acm non-conjugué ou avec un Acm inadéquat. Après les lavages
10 finaux, on a remis en suspension les cellules dans 0,3 ml d'une solution de formaline à 1% dans du PBS. Les anticorps purifiés ont été marqués à la biotine en utilisant un protocole standard. En bref, après dialyse dans un tampon carbonate (pH 8,8), on a incubé l'anticorps (1 mg/ml) pendant 15 min. à température ambiante avec de l'act-biotine (IBF, Villeneuve-La-
15 Garenne, France). On a arrêté la réaction par addition de NH_4Cl 1M, et on a éliminé la biotine libre par filtration sur gel. On a conservé congelés les Acm conjugués à -70°C jusqu'à leur utilisation. Les émissions par fluorescence du FITC et du PE ont été discriminées en utilisant des filtres passe-bandes à 530 ± 15 et $575 \pm 12,5$.

20 5. Modulation induite par le PMA de l'expression à la surface de la cellule.

Des PBMC ont été incubées avec du PMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) à 1 $\mu\text{g/ml}$ dans un milieu de culture contenant 10% de FCS pendant les temps indiqués. Après un lavage complet, les cellules ont été marquées en immunofluorescence indirecte en utilisant une batterie
25 d'anticorps monoclonaux contre diverses molécules de surface.

6. Marquage et immunoprécipitations de protéines de surface cellulaire.

Des cellules T humaines clonées ont été marquées en surface avec de la lactopéroxydase et quatre additions de H_2O_2 comme décrit précédemment. Les cellules ont alors été lysées dans un tampon de lyse
30 standard 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), contenant 1% (PV) de Nonidet P40, 0,15M de NaCl, 1 mg/ml de BSA et 2 mM de PMSF (Phényl Méthyl Sulfonyl fluoride), 20 mM d'iodoacétamide, et de l'aprotinine à 1 IU/ml comme inhibiteurs des protéases. Les immunoprécipitations et l'analyse par

SDS-PAGE ont été pratiquées comme décrit (22). Des analyses par électrophorèse sur gel bidimensionnelle non réductrice/réductrice en diagonale ont été pratiquées en utilisant des gels PHAST (Pharmacia) d'acrylamide à 7,5% pour la première et la seconde dimension selon les
5 recommandations du fabricant (Pharmacia, Uppsala, Suède). L'autoradiographie de plaques de gel séchées a été pratiquée à -70°C. Les poids moléculaires ont été calculés par référence à la mobilité de protéines standard.

Dans certaines expériences, à la suite de SDS-PAGE dans des
10 conditions réductrices, on a visualisé les bandes séparées par autoradiographie du gel séché, on les a excisées, digérées avec la protéase V8 dans un échantillon de tampon (à 1 mg/ml), et on a analysé les fragments dans une seconde expérience de SDS-PAGE. Les sucres à ponts azotés ont été éliminés par traitement des immunoprécipités spécifiques avec de
15 l'endo-bêta-N-acétylglucosaminidase-F (endo-F) (Boehringer Mannheim, Meylan France). On a effectué la digestion en portant à ébullition les immunoprécipités au BB18 et au BD16 pendant 4 minutes dans 50 µl de tampon au phosphate de potassium 100 mM, pH 6,5 contenant 50 mM d'EDTA, 0,5% de SDS et 1% de bêta-mercaptoéthanol. On a ajouté 100 µl
20 de tampon au phosphate de potassium 100 mM (pH 6,5) contenant 50 mM d'EDTA, 1% de NP40 et 1% de bêta-mercaptoéthanol avant l'addition de 12 µl (0,6 IU) d'endo-F. Après 24 h d'incubation à 37°C, on a arrêté la réaction par addition d'un échantillon de tampon.

7. Tests de prolifération.

25 50.000 PBMC ont été mises en culture en triple dans des plaques de 96 puits à fond arrondi (Costar, Cambridge, MA) dans un volume total de 0,2 ml de RPMI 1640, supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal dans un volume total de 0,15 ml de RPMI 1640, supplémenté avec 10% de sérum humain inactivé par la chaleur. Diverses concentrations
30 d'anticorps purifiés ont été ajoutées avec 0,2 ng/ml de PMA. Après diverses périodes de temps, les puits furent radiomarqués individuellement avec 1 µCi (1 Ci = 37 Gbq) de (³H)Tdr et récoltés 16 heures plus tard. L'incorporation du (³H)Tdr a été mesurée en utilisant un compteur à scintillation liquide (Rac Beta 1211/1212 LKB, Finlande).

8. Marquage au phosphate et immunoprécipitations

On a effectué le marquage au phosphore de la manière suivante. On a lavé deux fois des cellules T clonées dans un milieu dépourvu de phosphate contenant 5% de sérum AB humain dialysé et on les a ensuite incubées dans le même milieu à 50×10^6 cellules dans 1 ml pendant 30 minutes, à 37°C.

Ensuite, on a ajouté 1 mCi d'acide [^{32}P]-orthophosphorique. Après 3 heures de marquage, on a lavé les cellules deux fois dans du PBS avant leur lyse dans 2-3 ml de tampon contenant: 10 mM de Tris, pH 8.2, contenant 1% de NP-40, 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 1 mg/ml de BSA, 10 mM de NaF, 1 mM de PMSF et 10 mM d'iodoacétamide. Les immunoprécipitations et l'analyse par SDS-PAGE ont été pratiquées comme décrits (25).

9. Mesures de Ca^{2+} .

On a mesuré la concentration intracellulaire du Ca^{2+} comme décrit précédemment (26). En bref, on a lavé deux fois des cellules de Jurkat dans un milieu contenant 25 mM d'HEPES (pH 7,2), 125 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de Na_2HPO_4 , 1 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 , et 1% de glucose (toutes les incubations et les lavages ultérieurs ont été pratiqués dans le même milieu) et on les a remises en suspension à 30×10^6 cellules/ml en présence de 3 μM de Fura 2-AM (Calbiochem, meudon, France) pendant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité. Après cette période d'incubation, on a dilué vingt fois la suspension cellulaire et on l'a incubée pendant 30 minutes supplémentaires dans les mêmes conditions. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois et remises en suspension à 2×10^6 cellules/ml dans une cuvette à 37°C pour les mesures de Ca^{2+} .

II. RESULTATS

A) ETUDE DE L'Acm BB18

Dans une tentative pour définir les glycoprotéines de surface cellulaire spécifiques de l'activation, on a, selon l'invention, utilisé des Acm obtenus par immunisations répétées avec des clones de cellules T humaines hautement fonctionnelles (21). En particulier, on a initialement identifié sur le clone dénommé B12(22) de cellules T de thymus humain un Acm, dénommé BB18, reconnaissant un nouveau dimère à liaison disulfure

composé de sous-unités de 150 ± 10 kDa. Cette structure qui est faiblement exprimée sur des lymphocytes normaux de sang périphérique, se retrouve rapidement fortement exprimée pendant l'activation.

5 A.1. Les Acm BB18 réagissent fortement avec les cellules T clonées et faiblement avec les cellules T humaines au repos par cytofluorométrie de flux.

Afin d'obtenir des anticorps monoclonaux définissant les étapes de l'activation du lymphocyte T, on a immunisé des souris Balb/c âgées de six semaines avec des cellules thymiques clonées humaines (22).
10 Un Acm de l'isotype IgG1, nommé BB18, a été ainsi isolé. Le Tableau 1 résume la réactivité de l'Acm susmentionné avec de nombreuses cellules humaines normales et hématopoïétiques malignes. La molécule reconnue par cet Acm est faiblement exprimée sur des cellules T au repos mais pas du tout sur des cellules B provenant du sang périphérique ou d'organes
15 lymphoïdes. Parmi les lignées cellulaires lymphoïdes leucémiques testées, toutes les cellules T étaient vivement marquées, tandis que les lignées cellulaires du lymphome de Burkitt n'étaient pas réactives. D'autres lignées cellulaires malignes telles que K562 (érythroleucémie), U937 (monocytaire), HL60 (promélocytaire) ou SKNSH (neuroblastome) n'étaient pas réactives.
20 En revanche, des cellules T activées de longue date (clones de cellules T IL2-dépendants) ou B (lignées cellulaires B EBV-transformées) se sont révélées positives avec cet Acm. De plus, le BB18 marquait fortement la lignée YT de cellules tumorales NK, CD3 négatives activées et son mutant CD 25 négatif, YT2C2. La structure reconnue par BB18 apparaît comme
25 fortement exprimée immédiatement après l'activation cellulaire comme le montre l'expérience cinétique représentative pratiquée avec des cellules mononucléaires du sang périphérique d'un individu normal stimulé avec de la PHA (Figure 1). L'accroissement précoce dans son expression s'est effectué en parallèle à celle du CD25 pendant les premiers jours de
30 l'activation de la cellule T, mais elle est restée persistante. Un accroissement similaire de la réactivité au BB18 a été aussi observé quand les lymphocytes du sang périphérique (PBL) étaient stimulés soit avec des cellules allogéniques, un Acm CD3, ou l'IL2 (données non présentées). Par conséquent, l'accroissement de la réactivité avec l'Anticorps BB18 définit
35 clairement l'état d'activation chez les lymphocytes T.

TABLEAU I

Réactivité de l'Anticorps BB18 avec des populations de cellules hématopoïétiques

| 5 | Type de cellules | % cellules positives ^a |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| Population de cellules normales : | | |
| | PBL E ⁻ (10) | 100 ^b |
| | PBL E ⁻ (5) | <5 |
| 10 | lymphocytes activés par la PHA (10) | 100 |
| | cellules T clonées IL2 dépendantes (10) | 100 |
| | monocytes (5) | <5 |
| | granulocytes (3) | 100 ^b |
| | cellules sanguines rouges (3) | <5 |
| | plaquettes (3) | <5 |
| | cellules du thymus (3) | 30 |
| | cellules d'amygdales E ⁺ (2) | 100 |
| 15 | cellules d'amygdales E ⁻ (2) | <5 |
| | cellules de rate E ⁺ (2) | 100 ^b |
| | cellules de rate E ⁻ (2) | <5 |
| | cellules EBV transformées (5) | 100 ^b |
| Cellules malignes hématopoïétiques : | | |
| | CEMT | 100 |
| 20 | MOLT4 | 100 |
| | YT2C2 | 100 |
| | Daudi | <5 |
| | Namalva | <5 |
| | NALM 6 | 100 |
| | U937 | <5 |
| | HL60 | <5 |
| | K562 | <5 |
| 25 | Cellules malignes non hématopoïétiques : | |
| | SKNSH (neuroblastome) | <5 |
| | U373MG (glioblastome) | <5 |

30 a Réactivité déterminée par microfluorométrie de flux

b Toutes les cellules ont été faiblement marquées par de l'Acm BB18

A.2. L'intensité de la réactivité avec l'Anticorps BB18 se trouve diminuée peu de temps après l'incubation avec du PMA.

Comme l'expression de plusieurs structures inductibles par activation est régulée positivement par le PMA, on a voulu déterminer si le PMA était capable d'augmenter rapidement la réactivité avec l'Anticorps BB18. De manière surprenante, après une incubation de 6 heures avec du PMA à 1 µg/ml, le marquage avec l'Anticorps BB18 n'était plus détectable. Comme on le montre dans l'expérience représentative présentée à la Figure 2, la réactivité des cellules T au CD3, au CD4 et à l'Anticorps BB18 diminue lorsqu'on ajoute du PMA aux cultures. Plus précisément, après 6 heures avec du PMA, la régulation négative de la molécule réagissant avec l'Anticorps BB18 est maximale tandis qu'une fraction importante des cellules avait perdu l'expression du CD4. La modulation de la molécule CD3 atteint son maximum après 24 heures tandis que la modulation du CD4 est achevée dès après 10 heures. En revanche, comme on l'a rapporté précédemment après 24 heures de culture en présence de PMA, le CD25 est induit et l'expression de CD8 n'est pas modifiée par ce traitement.

A.3. Analyse biochimique de la molécule immunoprécipitée par l'Acm BB18 après marquage de la surface cellulaire.

Afin de définir la molécule identifiée par l'Acm BB18, des clones de cellules T humaines ont été marqués avec de l'Iode 125 sur leur face externe, selon la méthode à la lactopéroxydase, et lysés. Les immunoprécipités au BB18 obtenus à partir de ces lysats de cellules marquées ont été ensuite analysés par SDS-PAGE. L'autoradiographie montrée à la Figure 3 indique que l'Acm BB18 immunoprécipite, à partir d'un clone de cellules T représentatif. Une bande prédominante migrant sous des conditions non-réductrices avec une Masse moléculaire d'approximativement 300 kDa. Des Acm CD18"M232" utilisés comme contrôle immunoprécipitent trois bandes de protéines à partir du même lysat caractéristiques des molécules CD18 et de deux différentes molécules CD11, tandis qu'aucune bande de protéine n'est obtenue avec un Acm inapproprié de type IgG1. De plus, comme on le montre à la Figure 4, l'immunoprécipité obtenu avec l'Anticorps BB18 consiste principalement en

homodimères liés par des ponts disulfures d'environ 300 kDa dans la première dimension non-réductrice, qui se résoud dans une seconde dimension réductrice en une bande protéique prédominante d'environ 150 kDa en dessous de la diagonale du gel à deux dimensions.

5 4. Une stimulation avec des Acm BB18 solubles induit une prolifération des LSP en présence d'une concentration submitogénique de PMA.

Il a été montré précédemment que la stimulation de certaines molécules de surface, avec leur anticorps agoniste, en conjonction avec du PMA, induit une prolifération des lymphocytes T (24, 25, 26). Par
10 conséquent, on a testé la possibilité que la prolifération cellulaire puisse être induite par des doses submitogéniques de PMA et des Acm BB18 purifiés. Les résultats d'une expérience représentative de cinétique, montrés à la Figure 5, indiquent que des Acm BB18, utilisés soit à 5 soit à 10 µg/ml avec 0,2 ng/ml de PMA, induisent une forte réponse proliférative
15 sur des PBMC fraîchement isolées atteignant un pic au jour 4. Dans des conditions expérimentales similaires, un Acm CD1"404" d'isotype identique s'est avéré incapable de déclencher une prolifération de lymphocytes, tandis qu'ainsi qu'on l'a rapporté précédemment, un Acm CD3 stimule vigoureusement la prolifération cellulaire.

20 On a donc identifié une nouvelle structure de surface de cellule lymphocytaire humaine avec l'Acm dénommé BB18. La molécule immunoprécipitée en utilisant le BB18, à partir de lysats de lymphocytes T clonés marqués en surface est apparue comme étant un homodimère lié par des ponts disulfures comprenant des sous-unités d'environ 150kDa. Cette
25 structure est faiblement détectable sur des lymphocytes T de sang périphérique au repos, tandis que son expression augmente rapidement après l'activation de la cellule T et se maintient à ce niveau élevé pendant un certain temps après le déclenchement initial. Au surplus, l'Anticorps BB18 réagit vivement avec toutes les cellules T clonées testées quel que
30 soit leur phénotype CD4/CD8 et leur TcR (données non présentées). La distribution cellulaire indique que l'Acm BB18 ne réagit pas avec des cellules B au repos, tandis que des cellules B EBV-transformées de longue date sont faiblement marquées.

En revanche, des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt (Daudi et Namalva) manquent clairement de réactivité. Qui plus est, des lignées cellulaires lymphoïdes leucémiques mais pas myélomonocytiques sont réactives au BB18. La distribution cellulaire, ainsi que l'analyse biochimique de la structure reconnue par BB18, ont établi que cette

5 molécule est différente de toutes les structures de surface de leucocytes précédemment connues.

Les fonctions d'autres molécules de surface, telles que LFA-1, CD4 et CD8 ont été démontrées par la faculté de certains AcM spécifiques d'inhiber les activités tueuses naturelles ou cytotoxiques des lymphocytes T.

10 Les tentatives pour inhiber, avec un AcM BB18 purifié, la fonction cytotoxique de lymphocytes allosensibilisés in vitro 6d., de lymphocytes T clonés cytotoxiques ou de cellules NK n'ont pas été couronnées de succès. Les résultats suggèrent que l'épitope reconnu par l'AcM BB18 n'est pas

15 impliqué dans les fonctions cytotoxiques, pas plus que dans l'adhésion de l'effecteur à la cellule cible.

Le fait que des cocultures de PBMC avec des concentrations submitogéniques de PMA et de l'AcM BB18 purifié aient eu pour résultat une réponse proliférative vigoureuse, atteignant un maximum au jour 4 est

20 particulièrement intéressant. Néanmoins, la réponse comitogénique mesurée dans ces conditions expérimentales n'atteint pas la magnitude de la réponse observée avec un déclenchement au CD3. Il est à noter que les réactivités au CD3 et au BB18 diminuent toutes deux après incubation des LSP avec du PMA. Néanmoins, la cinétique de la diminution de réactivité est différente

25 pour les deux structures.

Plusieurs molécules ont été décrites, lesquelles, une fois mises en réaction avec un AcM agoniste dans des conditions appropriées, sont capables de transduction de signaux comitogéniques avec du PMA. La molécule CD28, un homodimère de 44 kDa à ponts disulfure, exprimé de

30 manière préférentielle sur une sous-population de cellule T, a été la première structure décrite induisant des signaux costimulateurs (25, 26). Il a été montré que l'effet s'exerce par régulation de la stabilité de l'ARNm codant pour les lymphokines (27).

D'autres exemples de molécules médiatrices de signaux costimulateurs incluent la molécule CD26 (4, 5), identifiant la dipeptidylpeptidase IV, qui est une structure de 120 kDa ; CD69, un hétérodimère d'activation très précoce à ponts disulfure, de 28, 32 kDa (17, 18) ; la molécule spécifique de la cellule T identifiée par l'Acm 10D1, qui est un homodimère à ponts disulfure de 90 kDa (28) ; CD60"UM4D4" reconnaissant une structure hydrocarbonée exprimée sur divers gangliosides (29). Les Acm CD43 sont particulièrement intéressants, identifiant une glycoprotéine fortement sialylée de 95 kDa, laquelle de manière similaire aux Acm CD3 et CD2 peut directement déclencher l'activation des cellules T en présence de monocytes. Il a été rapporté récemment qu'un anticorps monoclonal réagissant avec CD5, à la différence de l'Acm du CD5 précédemment décrit, était capable d'induire une prolifération de cellules T en présence de monocytes (15). Cela a évoqué la possibilité que seuls certains épitopes de la molécule CD5, comme dans le cas de la CD2, soient impliqués dans l'activation des cellules T. Finalement, il convient de mentionner que, contrairement à l'épitope reconnu par l'Anticorps BB18, l'expression de surface de la majorité des structures de transduction du signal n'est pas augmentée durant l'activation de la cellule.

Bien que des cellules T humaines puissent être activées par le biais de plusieurs molécules de surface distinctes, ces voies d'activation semblent partager des mécanismes de transduction de signal communs. Il est bien connu que l'activation de la cellule T via CD2 ou CD5, mais non pas via CD43 (16) est dépendante de l'expression de CD3-TcR. Bien qu'aucun lien physique de la molécule BB18 avec le CD3-TcR n'ait été démontré selon l'invention, (l'Acm a marqué les lymphocytes YT2C2 CD3-TcR négatifs), des liens sont possibles avec des composants tels que la chaîne ζ du CD3.

30 B) ETUDE DE L'ANTICORPS BD16

B.1. Les Acm BD16 et BB18 reconnaissent une structure identique sur les cellules T humaines

Afin d'obtenir des anticorps monoclonaux définissant les étapes de l'activation du lymphocyte T, on a immunisé de manière répétée

35

des souris Balb/c âgées de 6 semaines avec des cellules thymiques clonées humaines (22). On a rapporté ci-dessus qu'un Acn de l'isotype IgG1, nommé BB18, reconnaissait une molécule exprimée à un niveau faible sur des cellules T au repos, mais pas du tout sur des cellules B ou des monocytes du sang périphérique ou des organes lymphoïdes. De plus, la structure identifiée par BB18 est apparue comme fortement exprimée immédiatement après l'activation cellulaire. Ensuite, dans une fusion différente, on a isolé un second Acn, nommé BD16, présentant un motif de réactivité similaire dans des études d'immunofluorescence et immunoprécipitant une structure dimérique à ponts disulfure de 300 kDa provenant de la surface de la cellule T. Afin de déterminer si BB18 et BD16 identifiaient la même structure, on a pratiqué une analyse biochimique supplémentaire de la molécule immunoprécipitée par les deux Acn après le marquage de la surface cellulaire. Des clones de cellules T humaines ont été marqués sur leur surface externe, selon la méthode à la lactopéroxydase, et lysés. Les immunoprécipités de BB18 et BD16 obtenus à partir de ces lysats de cellules marqués ont reçu un traitement ou un traitement simulé avec de l'endo-F avant d'être analysés dans des conditions réductrices par SDS-PAGE. La Figure 6 représente une autoradiographie révélant une bande identique d'approximativement 120 kDa dans les deux immunoprécipités traités à l'endo-F, tandis que la bande caractéristique de 150 kDa a été obtenue avec les échantillons ayant reçu un traitement simulé. Ces résultats ont fortement indiqué que les deux Acn réagissaient avec une structure identique de la surface cellulaire. Une preuve supplémentaire a été obtenue après digestion par la protéase V8 de la bande de 150 kDa immunoprécipité au BB18 et au BD16, isolée à partir d'un gel one-D. Les résultats, présentés à la Figure 7, ont révélé que BB18 et BD16 étaient scindés en trois polypeptides principaux, ce qui a résulté en un motif de bandes identiques après la digestion à la protéase V8.

B.2. La structure de surface identifiée par les Acn BD16 et BB18 subit une régulation négative sur des PBL lors d'une préincubation avec BB18

Afin de déterminer si l'expression de la structure réactive avec les Acn BB18 BD16 était modifiée par une interaction avec ces Acn, on a incubé des PBL pendant des périodes variables avec des concentrations

saturantes soit de l'Acm, soit d'un IgG1 non pertinent comme témoin. La Figure 8 montre qu'après 8 heures d'incubation avec un Acm BB18, la structure réactive avec BB18 ou BD16 n'était plus détectée par un Acm biotinylé BB18 ou BD16. L'utilisation d'une Ig anti-souris de chèvre marquée au FITC a révélé que l'Acm BB18 n'était pas présent à la surface cellulaire des cellules préincubées avec l'Acm BB18 et ne pouvait pas être responsable du manque de réactivité du BB18 biotinylé. On notera que la modulation de la molécule réactive pour le BB18 n'a pas modifié la réactivité d'un Acm CD18"M232" vis-à-vis des cellules traitées. La même figure indique qu'une préincubation des PBL avec des concentrations saturantes de BD16 n'a produit qu'une modulation partielle de la molécule réactive au BD16/BD18, même après 24 heures de préincubation. De plus, les résultats présentés à la Figure 8 ont suggéré que BB18 et BD16 pouvaient identifier des épitopes distincts d'une structure de surface identique. L'Acm BB18 biotinylé a marqué un nombre de cellules comparable à celui des cellules marquées par l'immunoglobuline anti-souris de chèvre (GAM) marquée au FITC après 24 heures de pré-incubation des cellules avec l'Acm BD16, tandis que la fixation de l'Acm BD16 était complètement inhibée. Pour confirmer le fait que les deux Acm identifiaient des épitopes distincts, nous avons pratiqué une expérience supplémentaire, dans des conditions qui empêchaient une régulation négative de la structure de surface cellulaire réactive au BB18 (Figure 9). Alors qu'une quantité saturante de BB18 a inhibé la fixation du BB18 biotinylé et pas celle du BD16 biotinylé, sur les PBL, une quantité saturante de BD16 n'a pas empêché la fixation de BB18 biotinylé. Pris ensemble, ces résultats indiquent que BB18 et BD16 identifient deux épitopes distincts de la même structure de la surface lymphocytaire.

B.3. La molécule de surface cellulaire de 150 kDa réactive aux Acm BB18 et BD16 est une phosphoprotéine et l'Acm BD16 coprécipite une structure phosphorylée de 100 kDa.

On a pratiqué une caractérisation biochimique supplémentaire de la structure réactive au BB18 et au BD16 après marquage métabolique au ^{32}P de cellules T clonées. Dans des conditions non réductrices, on a obtenu une bande unique de 300 kDa pour les deux immunoprécipités (Figure 10), et dans des conditions réductrices, on a détecté une bande principale phosphoprotéique de 150 kDa (Figure 10 et Figure 11, partie gauche). Cette protéine a migré à exactement la même masse moléculaire

apparente que les bandes protéiques de 150 kDa observées après le marquage de la surface cellulaire (Figure 11, partie droite). On notera qu'on a observé régulièrement une bande phosphorylée supplémentaire de 100 kDa seulement dans les immunoprécipités au BD16 en conditions réductrices (Figure 10, partie droite et Figure 11, partie gauche). On n'a jamais observé cette bande supplémentaire dans les immunoprécipités de BD16 provenant de lysats de cellules marquées à seule face externe. Au surplus, la découverte du fait que cette bande phosphorylée de 100 kDa n'était pas visible dans les immunoprécipités de BD16 analysés dans des conditions non-réductrices (Figure 10, partie gauche), suggère que cette bande supplémentaire formait des multimères de masse moléculaire plus élevée n'entrant pas dans le gel.

B.4. L'Acm BB18, à la différence de l'Acm BD16, induit une mobilisation du calcium intracytoplasmique faible mais significative dans les cellules de Jurkat

On a précédemment rapporté que l'Acm BB18 déclenchait une prolifération des PBL lorsqu'on utilisait en conjonction avec des doses submitogéniques de PMA (30). Dans des conditions expérimentales similaires, l'Acm BD16 n'est pas parvenu à activer les PBL (données non présentées). Afin d'explorer les différences possibles de signalisation biochimique responsables de ces résultats contrastés, on a mesuré les concentrations intracellulaires en Ca^{2+} après incubation de la lignée cellulaire T Jurkat avec un Acm purifié BB18 ou BD16. Les résultats d'une expérience représentative sont présentés à la Figure 13 et indiquent qu'on a obtenu une augmentation faible mais reproductible de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire seulement avec l'Acm BB18. De plus, une addition ultérieure d'Acm CD3 purifié après l'Acm BB18 a résulté en la mobilisation rapide attendue de Ca^{2+} (Figure 12, courbe a). Il est à noter que la mobilisation de Ca^{2+} induite par l'Acm CD3 après l'incubation au BD16 (Figure 12, courbe b) avait régulièrement une magnitude inférieure à celle obtenue après le déclenchement au BB18. La réticulation de l'Acm avec un antisérum anti-souris de lapin n'a pas modifié le résultat.

B.5. La prolifération des PBL induite par le CD3 est inhibée par l'Acm BD16 mais pas par l'Acm BB18.

Afin d'étudier plus avant la différence entre les rôles joués par l'intermédiaire des deux épitopes reconnus par les Acm BB18 et BD16, on a étudié leur effet sur la réponse proliférative des PBL à un Acm CD3 "OKT3" soluble ou immobilisé. Comme on l'indique au Tableau 2, on a obtenu une réponse proliférative très forte des PBL avec l'Acm CD3 immobilisé sur du plastique, avec un pic de réponse le jour 4, tandis que la réponse des LSP à l'Acm soluble CD3 "OKT3" était d'une magnitude plus faible. Dans cette expérience cinétique représentative, l'Acm BB18 n'a pas modifié la réponse proliférative des PBL à l'AcmCD3, qu'il soit sous forme soluble ou immobilisé. Par contre, la présence d'Acm BD16 purifié dans la culture a induit une forte inhibition des réponses prolifératives induites par le CD3. On a observé cette inhibition à tous les points de mesure aussi bien dans le cas d'une prolifération induite par un CD3 soluble qu'immobilisé, et elle représentait approximativement une inhibition de 50%.

B.6. La prolifération des PBL induite par le CD2 est fortement accrue par l'Acm BD16 mais pas par l'Acm BB18.

En plus de l'Acm CD3, on a montré que certaines paires d'Acm CD2 étaient fortement comitogènes pour les LSP. Cet effet se manifeste en présence de nombres variables de cellules accessoires (31). On a testé les effets fonctionnels des Acm BB18 et BD16 sur une prolifération de LSP induite par le CD2. La Figure 13 montre qu'après le pic de prolifération attendu en réponse à DC2X11 et D66 au jour 4, la réponse a décliné très vite aux jours 5 et 6 (31). Dans cette expérience cinétique représentative, l'Acm BB18 n'a pas modifié la cinétique de la réponse proliférative des PBL. De façon surprenante, en présence d'Acm BD16 purifié dans la culture, la réponse proliférative maximale a été prolongée jusqu'au jour 5, et a diminué ensuite. Cela a résulté en un doublement de la cpm au jour 5. Enfin, cette réponse proliférative au CD2 prolongée, induite par l'Acm BD16, a été observée indépendamment de la paire d'Acm CD2 utilisée. Comme on l'indique au Tableau 3, au jour 5 de la culture, quand les réponses prolifératives à diverses paires de CD2 déclinaient, l'Acm BD16 a induit une prolifération accrue avec chacune des combinaisons de CD2. A

nouveau, on notera que cet effet d'amplification a été limité à l'Acm BD16 et n'a pas été observé avec l'Acm BB18 ou avec des Acm CD2 solitaires (données non présentées).

TABLEAU 2

L'Acm BD16 inhibe la prolifération de PBL induite par le CD3

| Culture | Incorporation de [3H]-TdR (cpm) | | |
|---------------------|---------------------------------|--------|--------|
| | Jour 3 | Jour 4 | Jour 5 |
| Milieu | 470* | 340 | 740 |
| CD3 immobilisé | 124790 | 232960 | 169030 |
| CD3 immobilisé+BB18 | 127340 | 235820 | 178230 |
| CD3 immobilisé+BD16 | 55670 | 110370 | 122650 |
| CD3 soluble | 4600 | 11590 | 11210 |
| CD3 soluble+BB18 | 6270 | 11730 | 14330 |
| CD3 soluble+BD16 | 1820 | 6350 | 6800 |

On a incubé des PBL fraîchement isolés pendant diverses durées avec ou sans Acm, ainsi que cela a été décrit dans la section "Matériel et Méthodes". Les Acm BB18, BD16 et CD3 solubles et purifiés ont été utilisés à des concentrations finales de 5 µg/ml.

* cpm incorporé par PBL. Les résultats sont exprimés comme la moyenne d'échantillons triplés pour lesquels le ESM a toujours été inférieur à 10% de la moyenne.

TABLEAU 3

L'Acm BD16 accroît la réponse proliférative des PBL à diverses paires de CD2

| 5 | Acm | Incorporation de [3H]-TdR en présence de | | |
|----|------------|--|----------|----------|
| | | Milieu | Acm BB18 | Acm BD16 |
| | Pas d'Acm | 810* | 440 | 2460 |
| | CD2X11-D66 | 37190 | 41380 | 73900 |
| 10 | CD2X11-GT2 | 7400 | 10040 | 21480 |
| | D66+GT2 | 4950 | 3500 | 9160 |

Les PBL ont été cultivées 5 jours dans le milieu, des Acm CD2 seuls avec ou sans BB18 ou BD16 comme témoin (résultats non exposés) ou une combinaison des Acm CD2 avec ou sans Acm BB18 ou BD16. Une prolifération significative n'a été observée que dans les puits contenant des paires d'Acm CD2. Les Acm CD2 ont été utilisées sous forme de fluide d'ascites dilués, alors que BB18 et BD16 étaient des Acm purifiés utilisés à des concentrations finales de 5 µg/ml.

* cpm incorporé par PBL. Les résultats sont exprimés comme la moyenne d'échantillons triplés pour lesquels le ESM a toujours été inférieur à 10% de la moyenne.

DEPOT DES ANTICORPS

Les lignées de cellules d'hybridomes produisant les anticorps BD16 et BB18 ont été déposées à l'European Collection of Animal Cell Cultures (Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 03G, England), le 7 janvier 1992 et ont reçu les numéros 92010801 pour l'anticorps BD16 et 92010802 pour l'anticorps BB18.

Les lignées de cellules d'hybridomes produisant les anticorps BM4, BM 71 et BM63 ont été déposées à l'European Collection of Animal Cell Cultures (Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 03G, England) le 12 janvier 1993 et ont reçu les numéros 93 011201 pour BM4, 93 011202 pour BM71 et 93 011203 pour BM63.

No de la demande internationale : PCT/

MICRO-ORGANISMES

Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page 23, ligne 27 à 35 de la description

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔTD'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire ☒

Nom de l'institution de dépôt

EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays)

Porton Down, Salisbury
Wiltshire SP4 03G
GRANDE-BRETAGNE

Date du dépôt

7 Janvier 1992

N° d'ordre

BD16/92010801

B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements ☐**C. ÉTATS DESIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES** (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)**D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT** (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., « No d'ordre du dépôt »)

E. ☐ La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office receveur)

N. SAADA

(Fonctionnaire autorisé)

☐ Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international

(Fonctionnaire autorisé)

25

feuille numero 25

Cadre annexe. Utiliser le présent cadre dans les cas suivants: SUITE

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :

Nom de l'institution de dépôt :

EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

PORTON DOWN, SALISBURY
WILSTRIVE SP4 03G
Grande-Bretagne

Date du dépôt :

7 janvier 1993

N° d'ordre :

8818 / 92010802

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :

Nom de l'institution de dépôt :

EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

PORTON DOWN, SALISBURY
WILSTRIVE SP4 03G
Grande-Bretagne

Date du dépôt :

12 janvier 1993

N° d'ordre :

884 / 92011201

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :

Nom de l'institution de dépôt :

EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

PORTON DOWN, SALISBURY
WILSTRIVE SP4 03G
Grande-Bretagne

Date du dépôt :

12 janvier 1993

N° d'ordre :

8871 / 92011202

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :

Nom de l'institution de dépôt :

EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

PORTON DOWN, SALISBURY
WILSTRIVE SP4 03G
Grande-Bretagne

Date du dépôt :

12 janvier 1993

N° d'ordre :

8863 / 92011203

Si le cadre annexe n'est pas utilisé, il n'est pas nécessaire d'insérer cette feuille dans la requête.

REFERENCES

1. Uchiyama, T., S. Broder, and T.A. Waldmann. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. *J. Immunol.* 126: 1393.
2. Smith, K.A. 1988. The interleukin 2 receptor. *Adv. Immunol.* 42: 165.
3. Trowbridge, I.S. and F. Lopez. 1982. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1175.
4. Fleisher, B. 1987. A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen. *J. Immunol.* 138 : 1346.
5. Higgs, J.B., W. Zeldes. K. Kozarsky, M. Schteingart. L. Kan, P. Bohlke, R. Krieger, W. Davis, and D.A. Fox. 1988. A novel pathway of human T lymphocyte activation : Identification by a monoclonal antibody generated against a rheumatoid synovial T cell line. *J. Immunol.* 140 : 3758.
6. Morimoto, C., N.L. Letvin, A.W. Boyd, M. Hagan, H.M. Brown, M.M. Kornacki and S.F. Schlossman. 1985. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J. Immunol.* 134 : 3762.
7. Amiot, M., A. Bernard, H.C. Tran, G. Leca, J.M. Kanellopoulos and L. Boumsell. 1986. The human cell surface glycoprotein complex (gp 120,200) recognized by monoclonal antibody K20 is a component binding to phytohaemagglutinin on T cells. *Scand J. Immunol.* 23 : 109.
8. Morimoto, C., N.L. Letvin, C.E. Rudd, M. Hagan, T. Takeuchi and S.F. Schlossman. 1986. The role of the 2H4 molecule in the generation of suppressor function in Con A activated T cells. *J. Immunol.* 137 : 3247.
9. Ledbetter, J.A., N.K. Tonk, E.H. Fischer and E.A. Clark. 1988. CD45 regulates signal transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 8628.

10. Bernard, A., C. Gelin, B. Raynal, D. Pham, C. Gosse and L. Boumsell. 1982. Phenomenon of human T cells rosetting with sheep erythrocytes analyzed with monoclonal antibodies. Modulation of a partially hidden epitope determining the conditions of interaction between T cells and erythrocytes. *J. Exp. Med.* 155 : 1317.
11. Meuer, S. C., R.E. Hussey, M. Fabbi, D. Fox, O. Acuto, R.A. Fitzgerald, J.C. Hogdon, J.P. Protentis, S.F. Schlossman, and E.L. Reinherz. 1984. A alternative pathway of T cell activation I a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36 : 897.
12. Dustin, M.L. and T.A. Springer. 1989. T cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-A. *Nature* 341 : 619.
13. Tedder, T.F., A.C. Penta, H.B. Levine and A.S. Freedman. 1990. expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identify with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J. Immunol.* 144 : 532.
14. Boumsell, L., H. Coppin, D. Pham, B. Raynal, J. Lemerle, J. Dausset and A. Bernard. 1980. An antigen shared by a human T cell subset and B-CLL cells : distribution on normal and malignant lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 152 : 229.
15. Spertini, F., W. Stohl, N. Ramesh, C. Moody and R.S. Geha. 1991. Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5. *J. Immunol.* 146 : 47.
16. Mentzer, S.J., E. Remold-O'Donnell, M.A.V. Crimmins, B.E. Bierer, F.S. Rosen and S.J. Burakoff. 1987. Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the wiskott-aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J. Exp. Med.* 165 : 1383.
17. Cebrián, M., E. Yagüe, M. Rincon, M. Lopez-Botet, M.O. de Landazuri, and F. Sàñches-Madrid. 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168 : 1621.
18. Nakamura, S., S.J. Sung, J.M. Bjordahl and S.M. Fu. 1989. Human T cell activation. IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA 1. *J. Exp. Med.* 169 : 677.

19. Ledbetter, J.A., C.H. June, L.S. Grosmaire and P.S. Rabinovitch. 1987. Crosslinking of surface antigens causes mobilization of intracellular ionized calcium in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 1384.
20. Chatila, T.A., and R.S. Geha. 1988. Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J. Immunol.* 140 : 4308.
21. David, V., H. Bachelez, G. Leca, L. Degos, L. Bousmell and A. Bensussan. 1990. Identification of a novel 110-kilodalton structure expressed on a subset of T cell receptor α -bearing cloned lymphocytes. *J. Immunol.* 144 : 1.
22. Bousmell, L., M. Schmid, H. Dastot, C. Goutefangeas, D. Mathieu-Mahul and A. Bensussan. 1990. In vitro differentiation from a pluripotent human CD4⁺CD8⁺ thymic cloned cell into four phenotypically distinct subsets. *J. Immunol.* 145 : 2797.
23. Bousmell, L. and A. Bernard. 1980. High efficiency of Biozzi's high responder mouse strain in the generation of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 38 : 225.
24. Hara, T. and S. M. Fu. 1985. Human T cell activation I. Monocyte independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens and antigens. *J. Exp. Med.* 164 : 641.
25. Hara, T., S. M. Fu, and J.A. Hansen. 1985. Human T cell activation. II. A new pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 KD polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med.* 161 : 1613.
26. Moretta, A., G. Pantaleo, M. Lopez-Botet, and L. Moretta. 1985. Involvement of Tp44 molecules in an antigen-independent pathway of T cell activation. *J. Exp. Med.* 162 : 823.
27. Thompson, C.B., T. Lindsten, J.A. Ledbetter, S.L. Kunkel, H.A. Young, S.G. Emerson, J.M. Leiden, and C.H. June. 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 1333.
28. Kobata, T., H. Yagita, H. Matsuda, S. Tansyo, H. Yakura, M. Katagiri and K. Okumura. 1990. A novel homodimeric molecule involved in human T cell activation. *J. Immunol.* 144 : 830.

29. Fox, D.A., L. Kan, L.S. Chan, O. Baadsgaard, K. Cooper and K. Kozarsky. 1989. Activation of a human T-cell subset through a newly identified surface structure termed UM-4D4. p 361 in Leucocyte Typing IV. W. Knapp Ed. Oxford University Press.
- 5 30. Bougeret, C. I-G. Mansur, H. Dastot, M. Schmid, G. Mahouy, A. Bensussan, and L. Boumsell. 1992. Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. J. Immunol. 148:318.
- 10 31. Huet, S., L. Boumsell, J. Dausset, L. Degos, and A. Bernard. 1988. The required interaction between monocytes and peripheral blood T lymphocytes (T-PBL) upon activation via CD2 or CD3. Role of HLA Class I molecules from accessory cells and the differential response of T-PBL subsets. Eur. J. Immunol. 18:1187.

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

1. Protéine antigénique consistant en une glycoprotéine phosphorylée de poids moléculaire de 150 ± 10 kDa déterminé par électrophorèse de type SDS PAGE dans des conditions réductrices, exprimée à la surface des lymphocytes T de sang humain de préférence activés.

2. Protéine antigénique sous forme d'un homo-dimère à liaison disulfure de poids moléculaire de 300 ± 20 kDa déterminé par électrophorèse de type SDS PAGE dans des conditions non réductrices, exprimée à la surface de lymphocytes T de sang humain de préférence activés, composée de sous-unités selon la revendication 1.

3. Dérivé d'une protéine selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il s'agit de la protéine ou un fragment comportant les sites antigéniques essentiels de la protéine, sous forme glycosylée ou non glycosylée ou comportant des glycosylations non naturelles.

4. Dérivé d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine ou un fragment de celle-ci comportant les sites antigéniques essentiels, sous forme phosphorylée ou non phosphorylée ou comportant des phosphorylations non naturelles.

5. Protéine ou dérivé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle comporte un marquage permettant son dosage in vitro ou sa localisation in vivo ou ex-vivo.

6. Anticorps dirigé contre la protéine selon l'une des revendications 1 à 5.

7. Anticorps monoclonal reconnaissant un épitope d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 5.

8. Anticorps selon la revendication 6 ou 7 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une immunoglobuline de sous-classe IgG₁.

9. Anticorps selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce qu'il est produit par une lignée de cellules d'hybridome déposée à l'ECACC sous le numéro 92010801 pour l'anticorps BD16.

10. Anticorps selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce qu'il est produit par une lignée de cellules d'hybridome déposée à l'ECACC sous le numéro 92010802 pour l'anticorps BB18.

11. Anticorps selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce qu'il est produit par une lignée de cellules d'hybridome déposée à l'ECACC sous le numéro 93 011201 pour l'anticorps BM4.

5 12. Anticorps selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce qu'il est produit par une lignée de cellules d'hybridome déposée à l'ECACC sous le numéro 93 011202 pour l'anticorps BM71.

10 13. Anticorps selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce qu'il est produit par une lignée de cellules d'hybridome déposée à l'ECACC sous le numéro 93 011203 pour l'anticorps BM63.

14. Anticorps selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisé en ce qu'il comporte un marquage permettant son dosage in vitro ou sa localisation in vivo ou ex-vivo.

15 15. Lignée de cellules d'hybridome, caractérisée en ce qu'elle est capable de produire l'anticorps monoclonal selon l'une des revendications 6 à 14.

16. Utilisation d'un anticorps monoclonal selon les revendications 9 à 13 pour immunoprécipiter des protéines selon les revendications 1 ou 2.

20 17. Kit de diagnostic comportant une protéine ou un des anticorps selon l'une des revendications 1 à 14.

18. Utilisation d'une protéine ou d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 14 pour le diagnostic rapide d'un état d'activation précoce des cellules T lymphocytaires.

25 19. Médicament comportant, à titre de principe actif, une protéine ou un anticorps ou leurs fragments selon l'une des revendications 1 à 14.

30

35

1/16

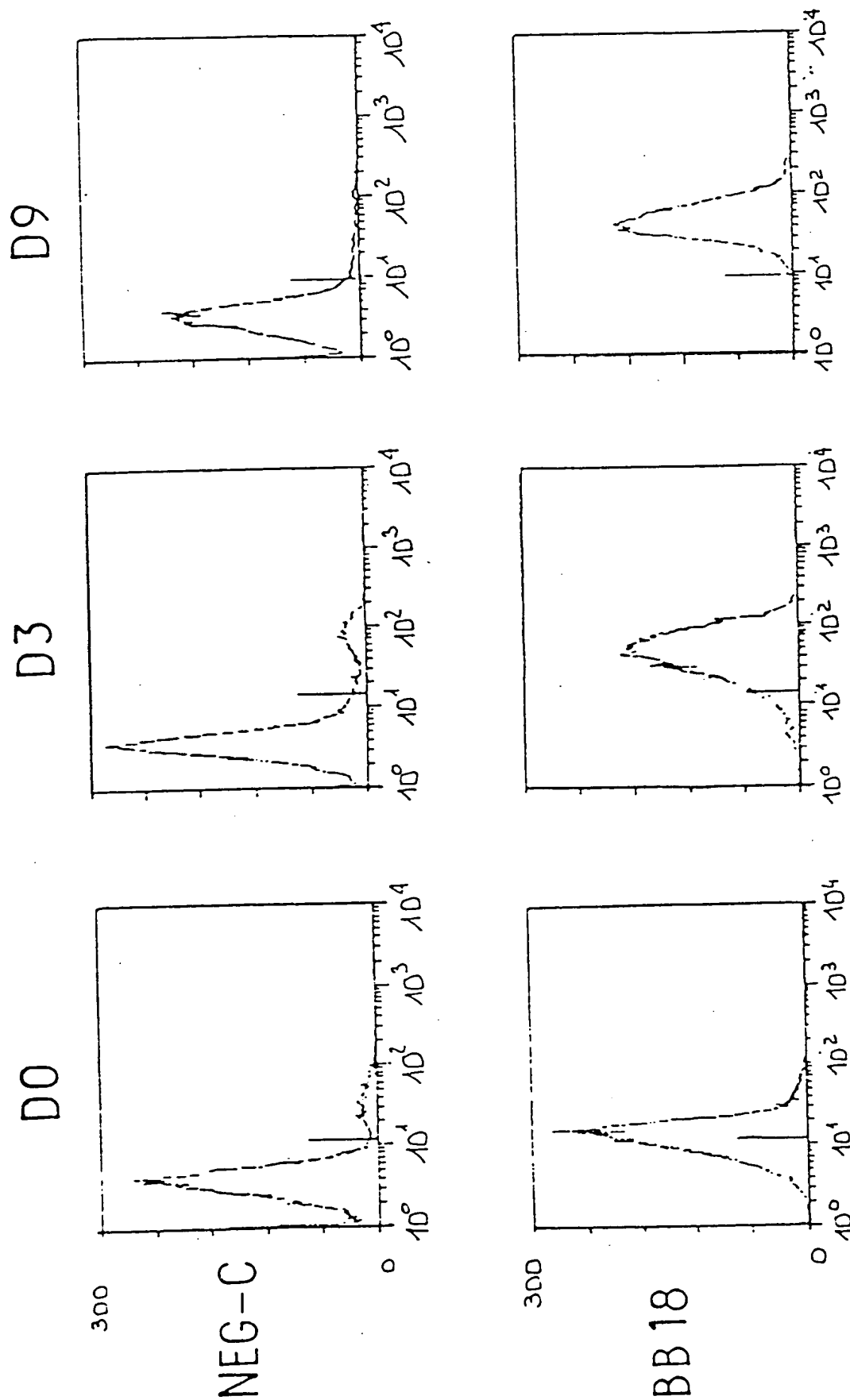


FIG. 1a

2/16

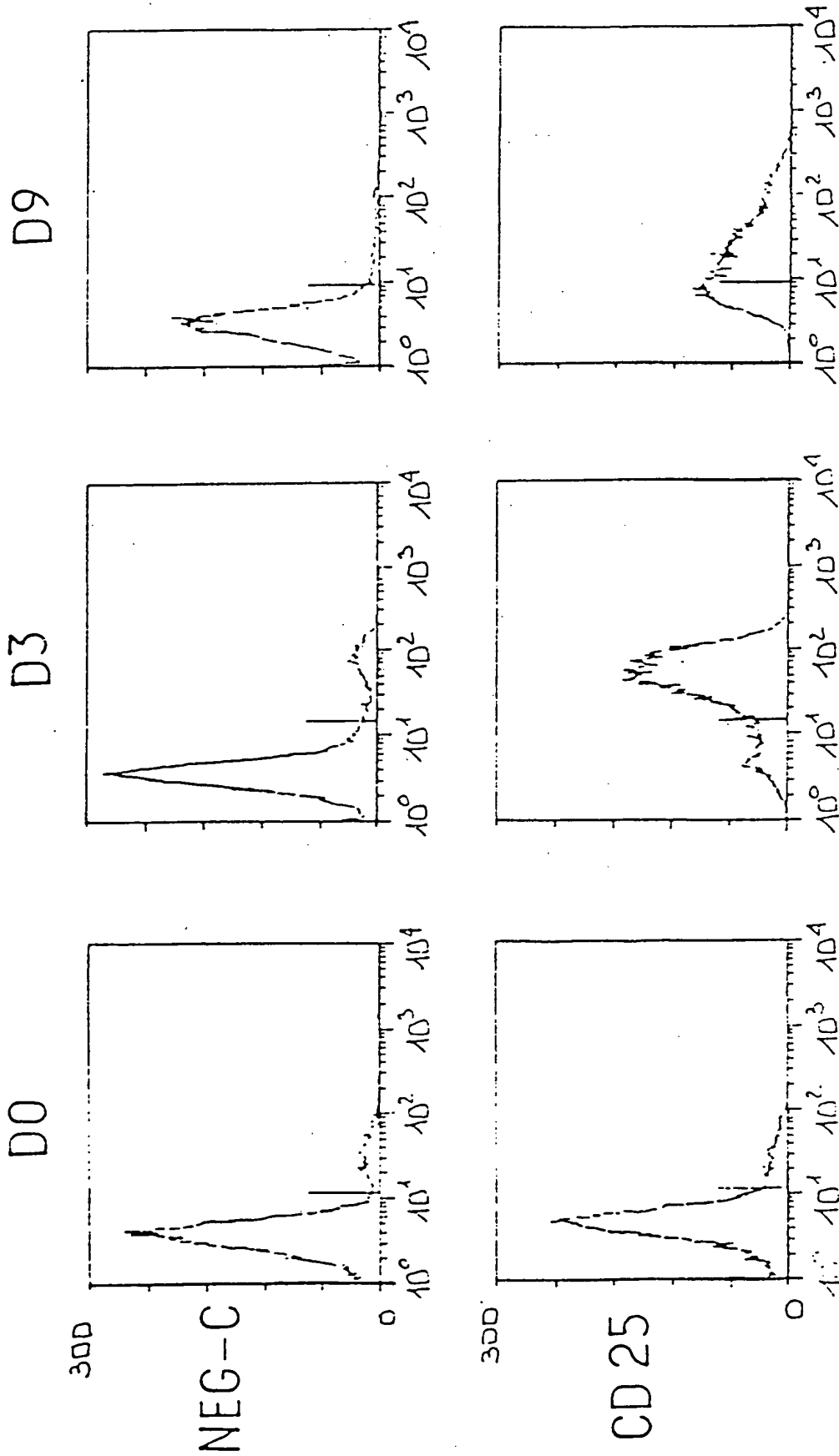


FIG. 1b

3/16

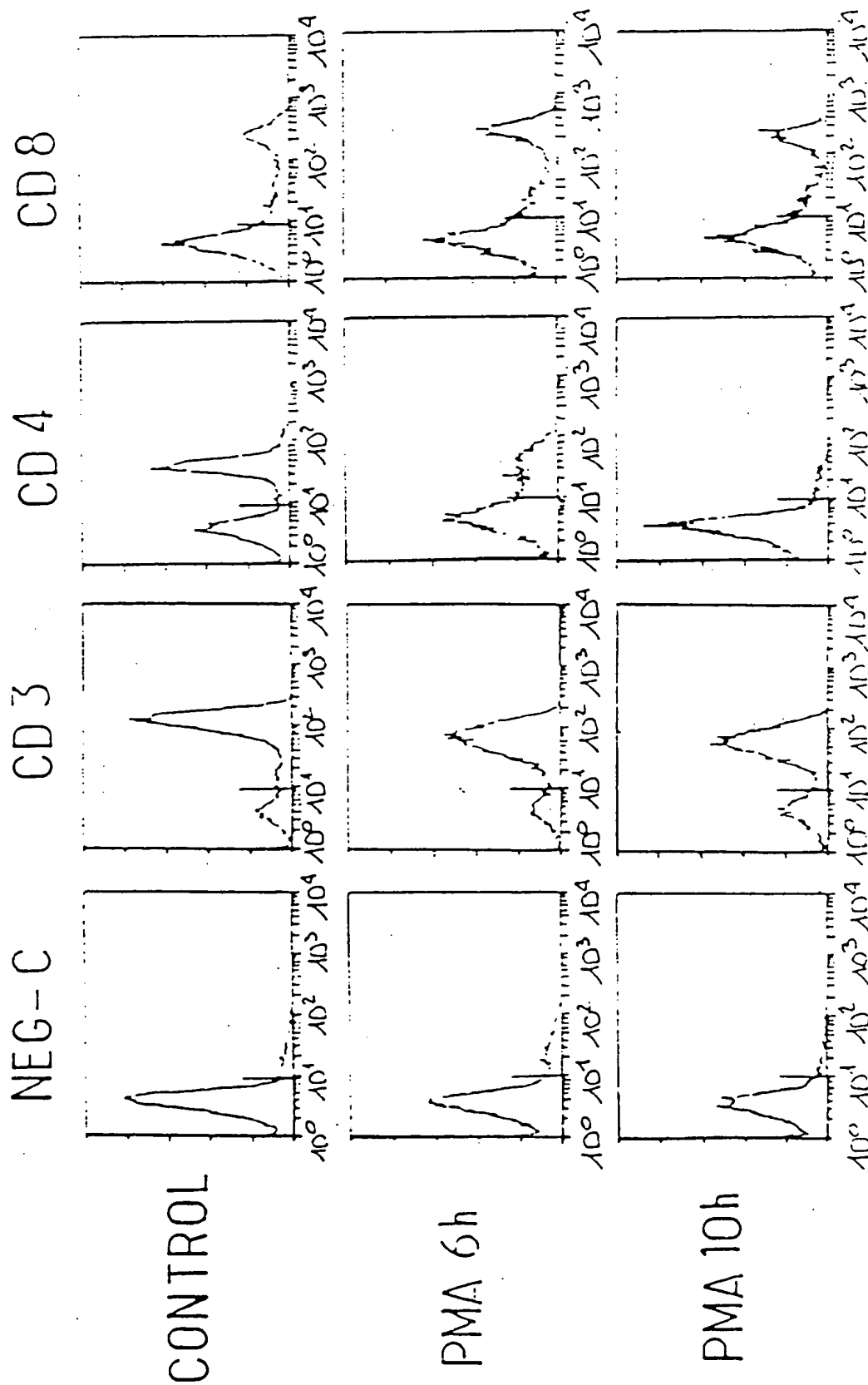


FIG. 2a

4/16

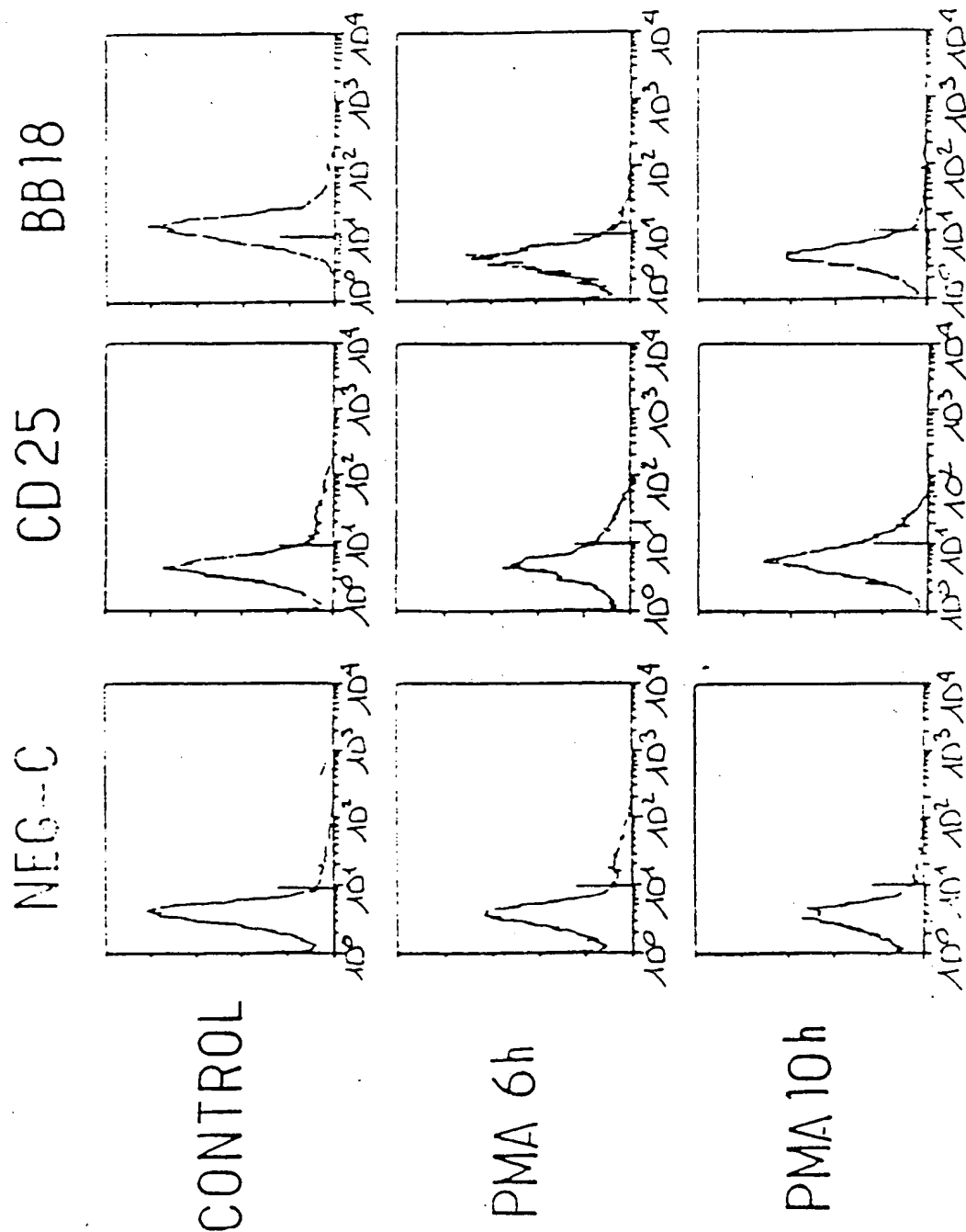


FIG. 2b

5/16

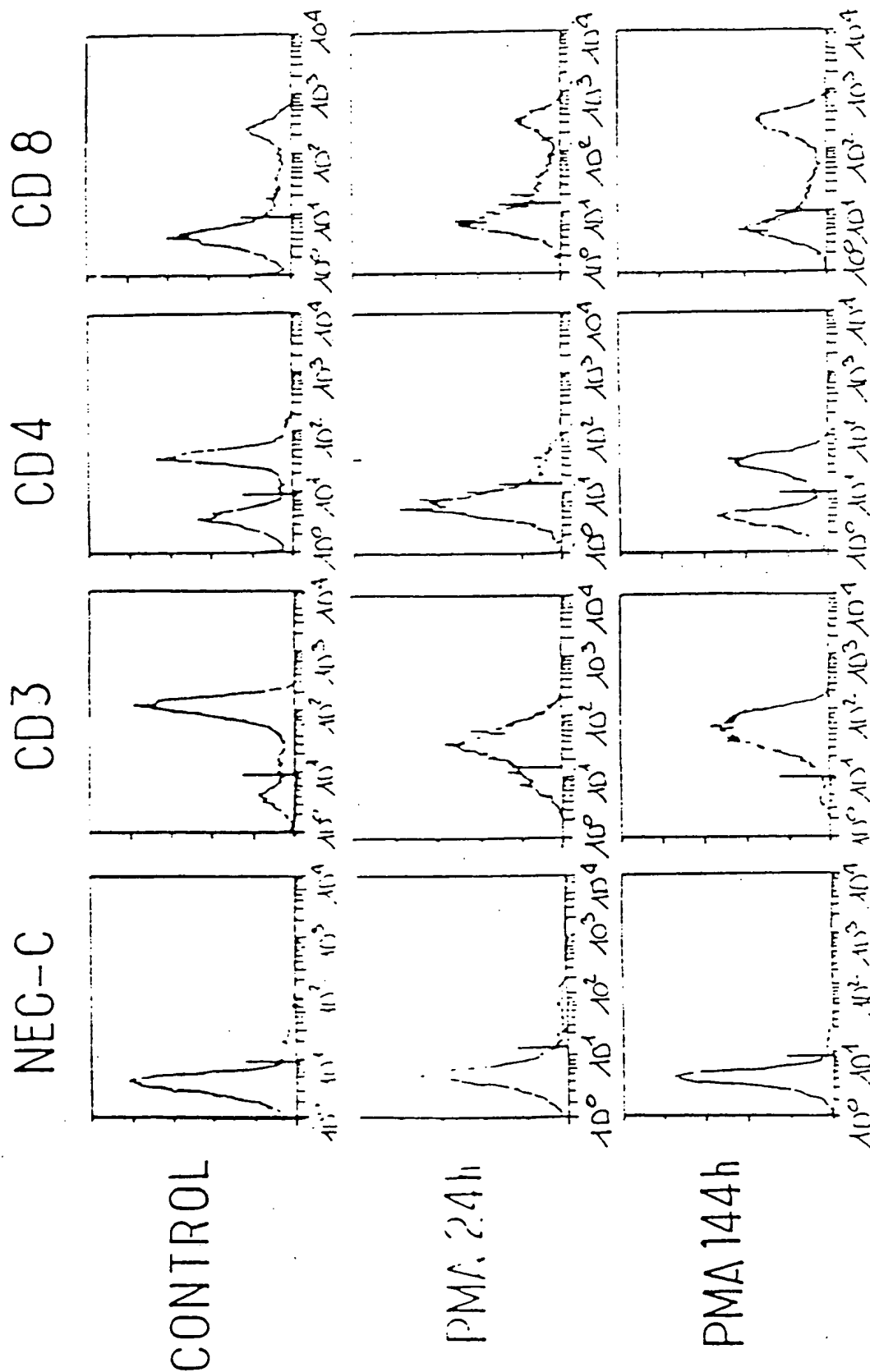


FIG. 2c

93243153

6/16

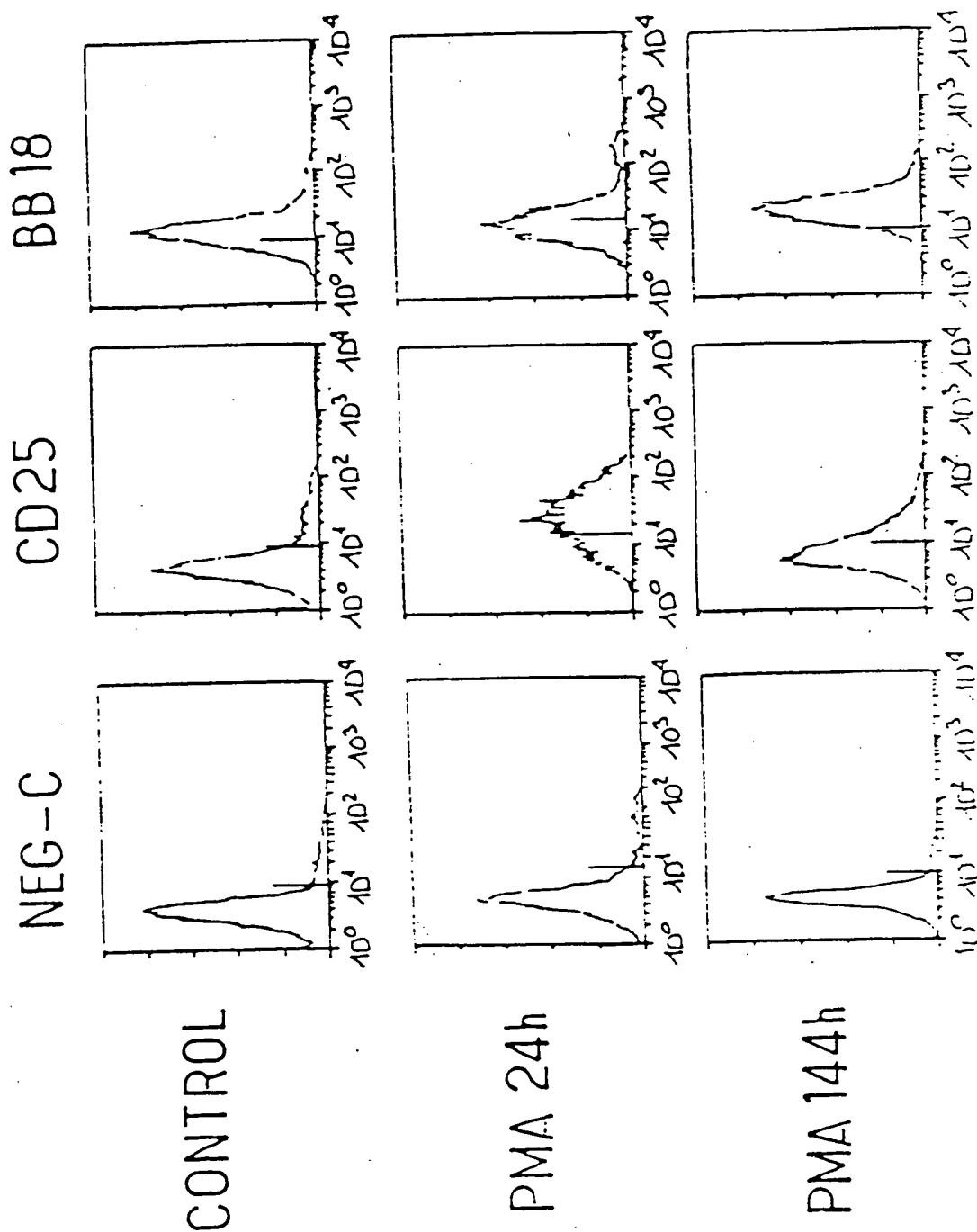


FIG. 2d

7/16

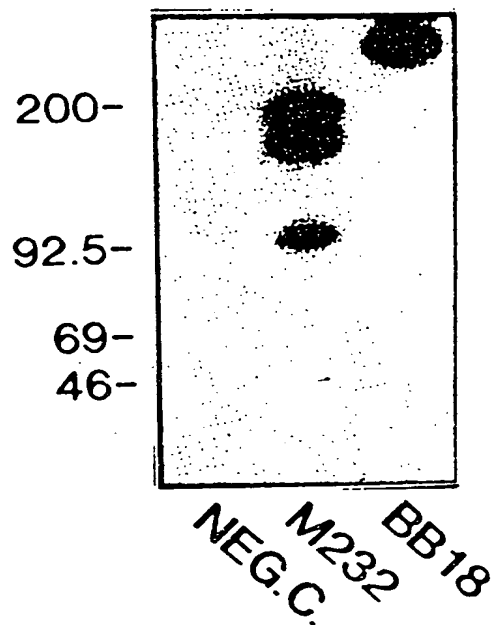


FIG.3

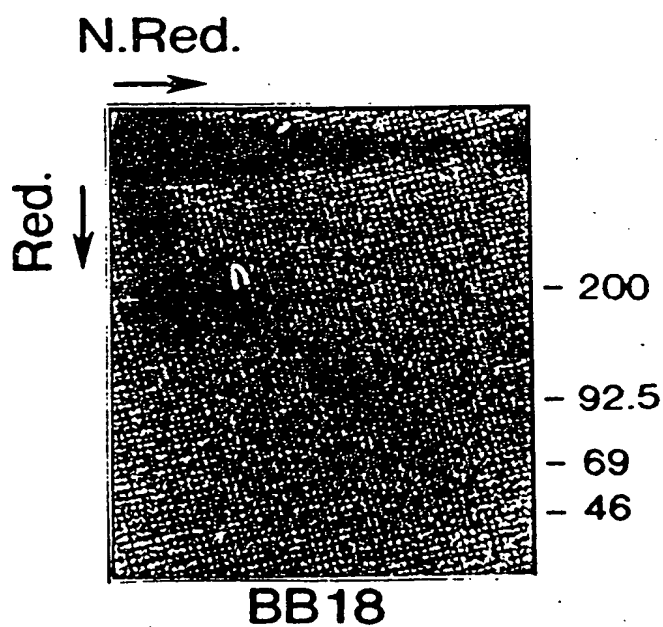
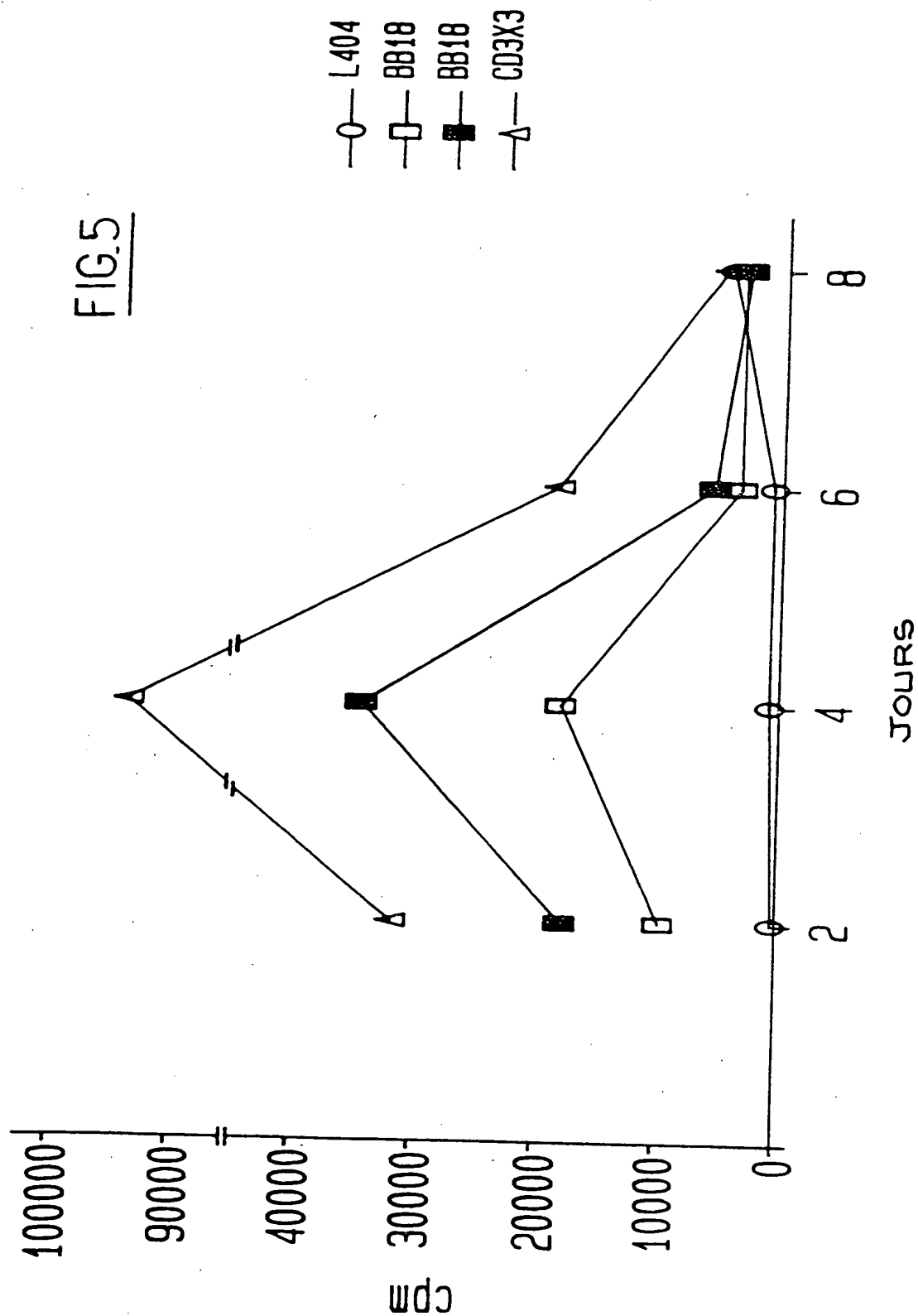


FIG.4

8/16



93243153

FEUILLE DE DEMANDE

9/16

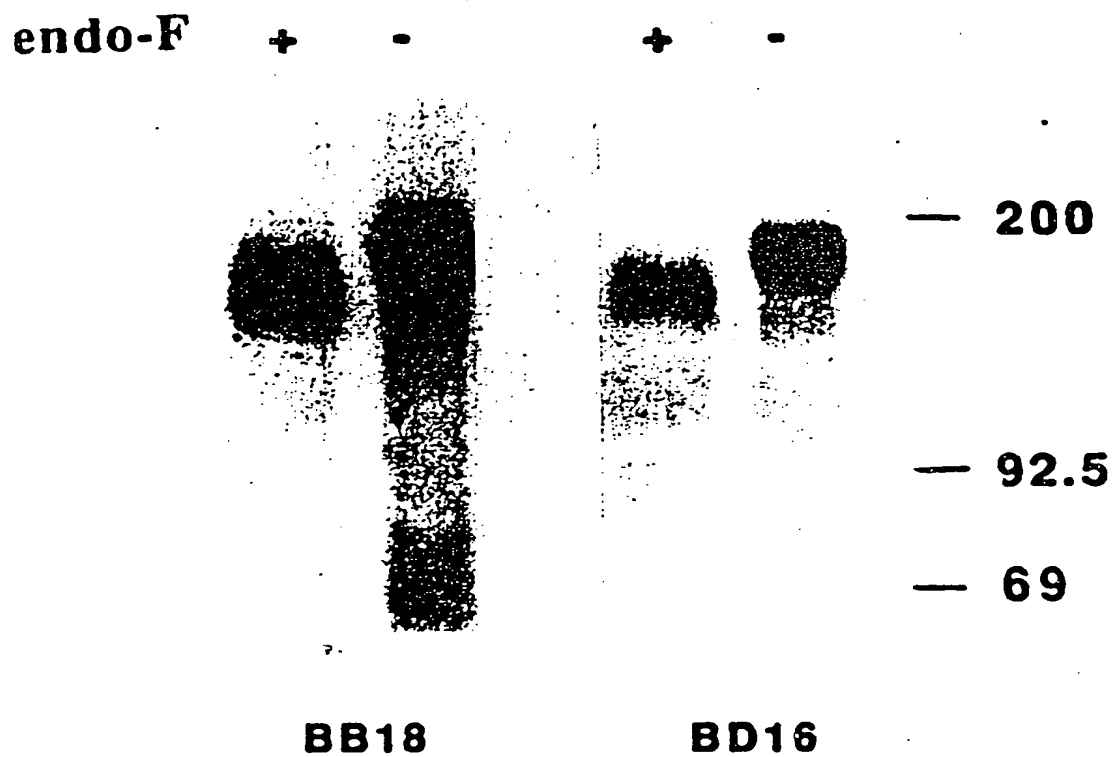
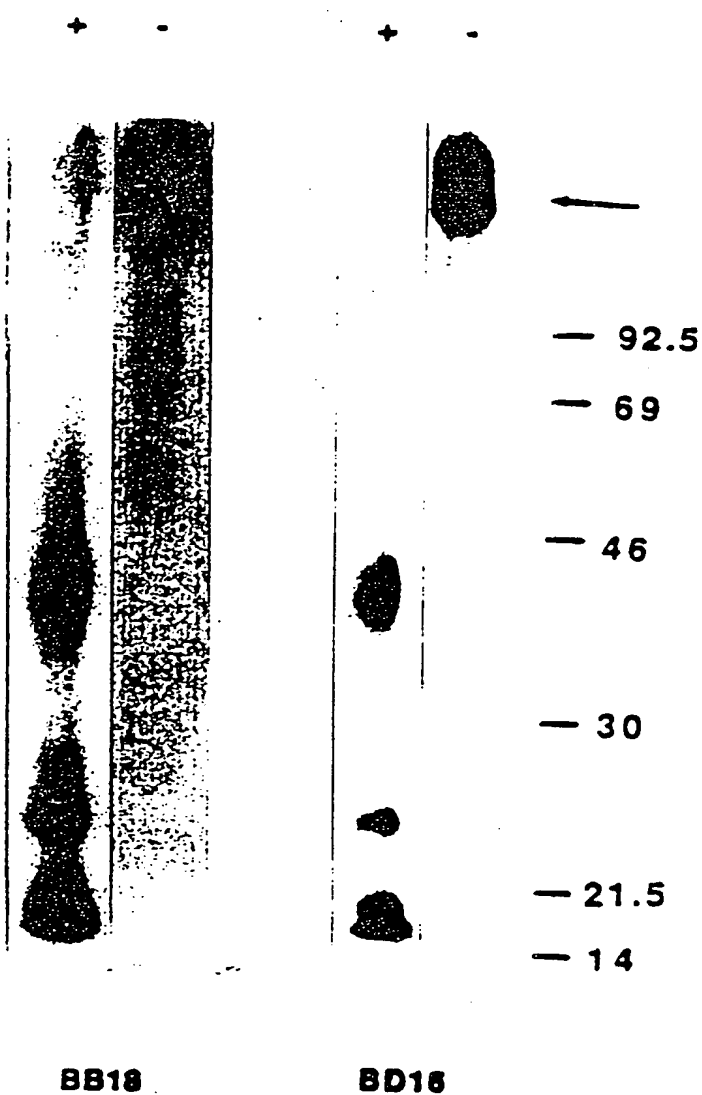


FIG. 6

93243153

10/16

protéase V8



FIG_7

93243153

11/16

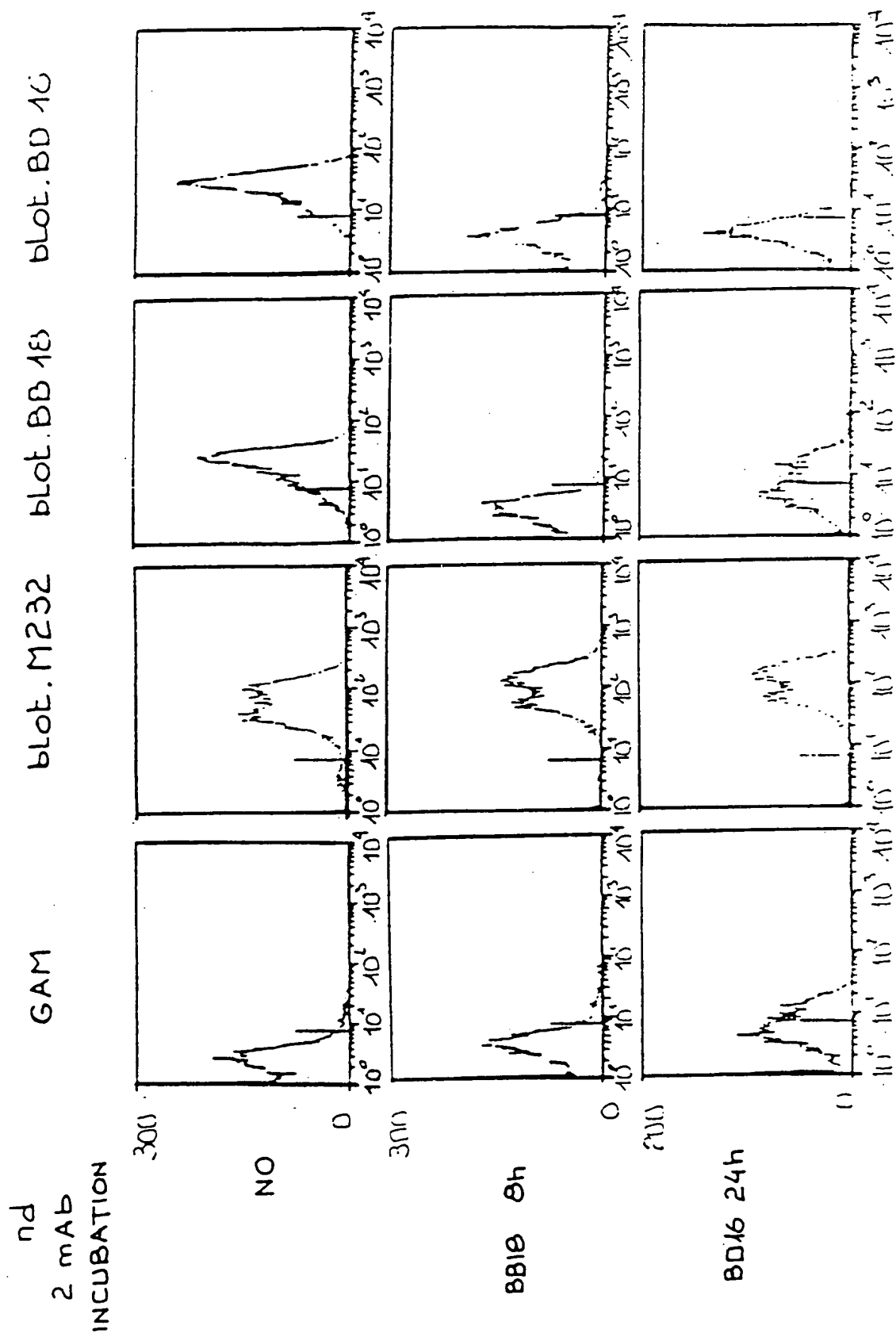


FIG.8

12/16

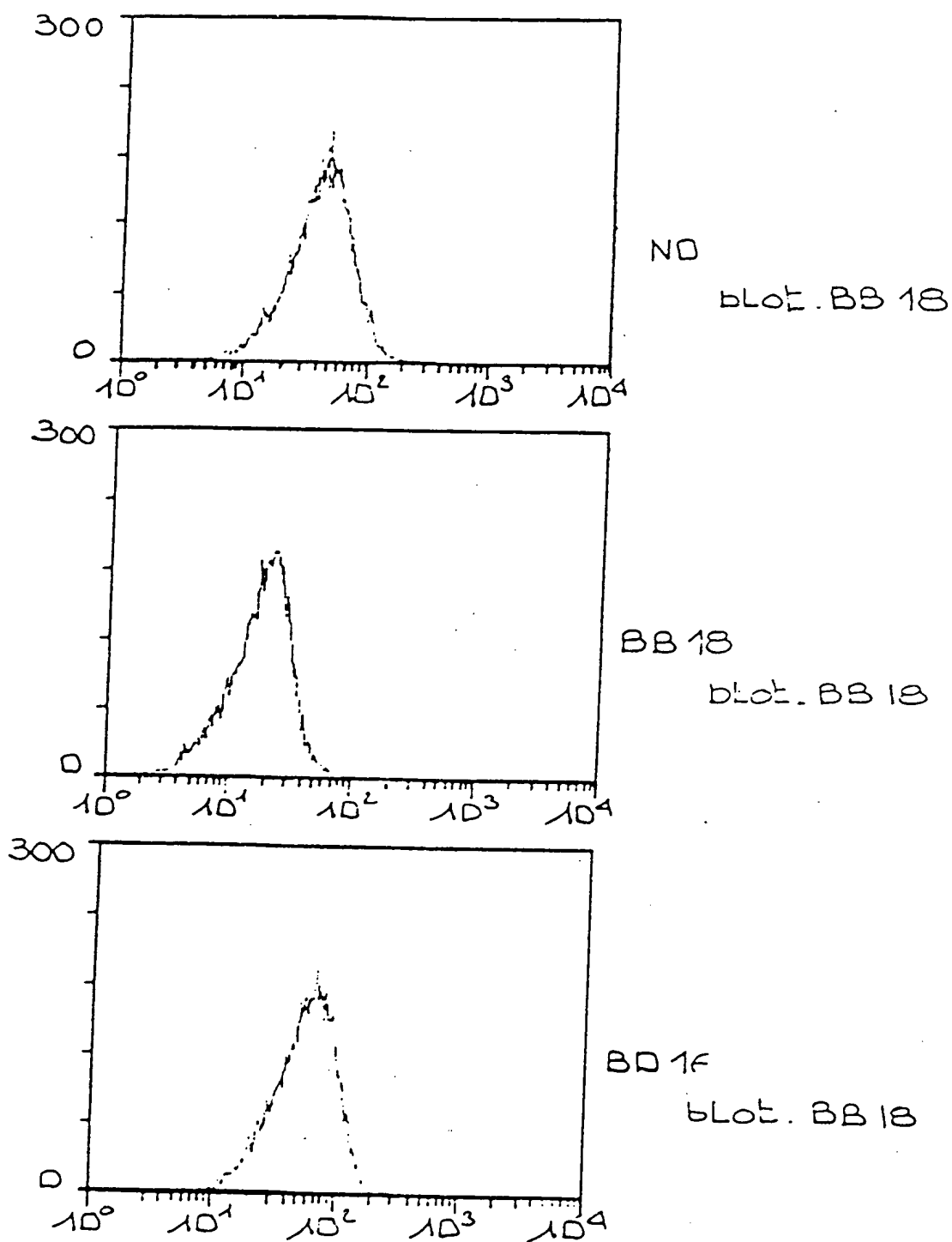
1st mAB2nd mAB

FIG. 9

93243153

FEUILLE DE REMPLACEMENT

13/16

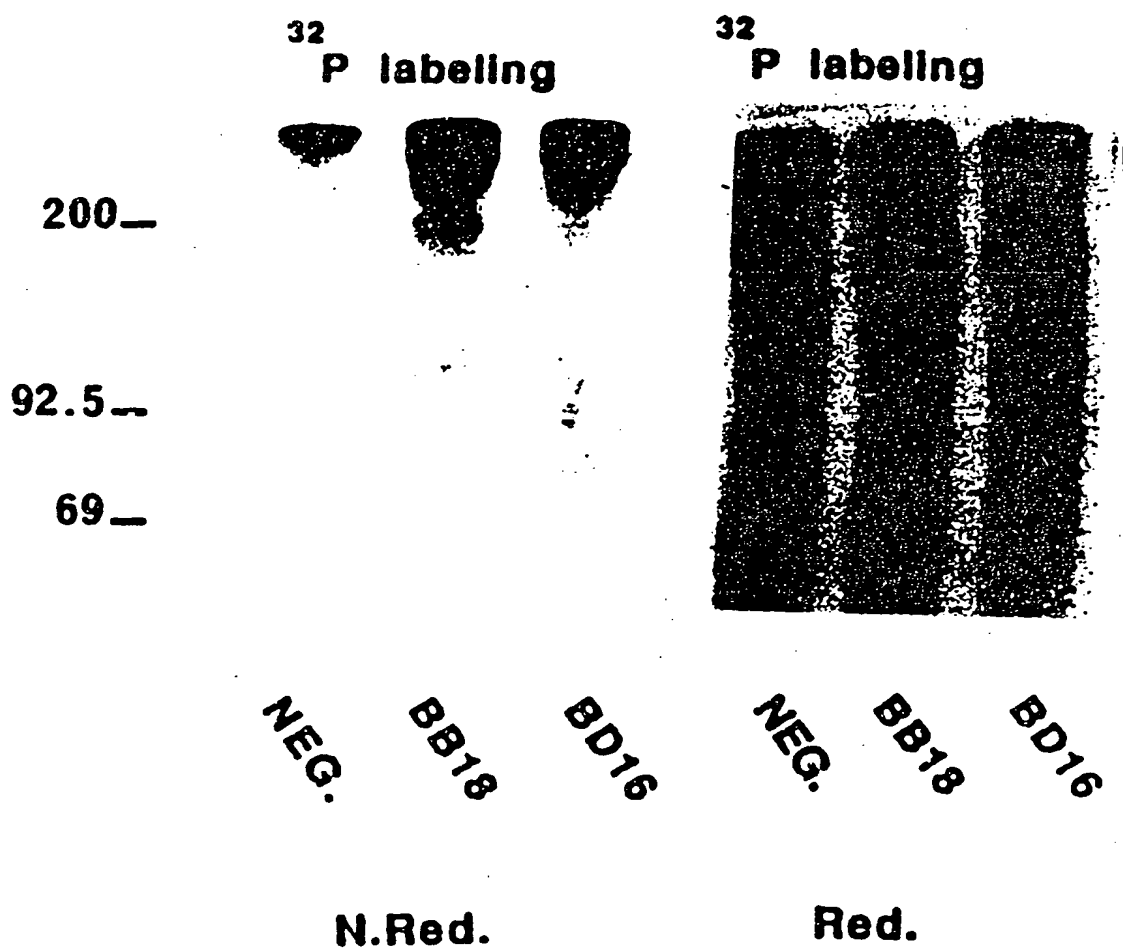


FIG.10

14/16

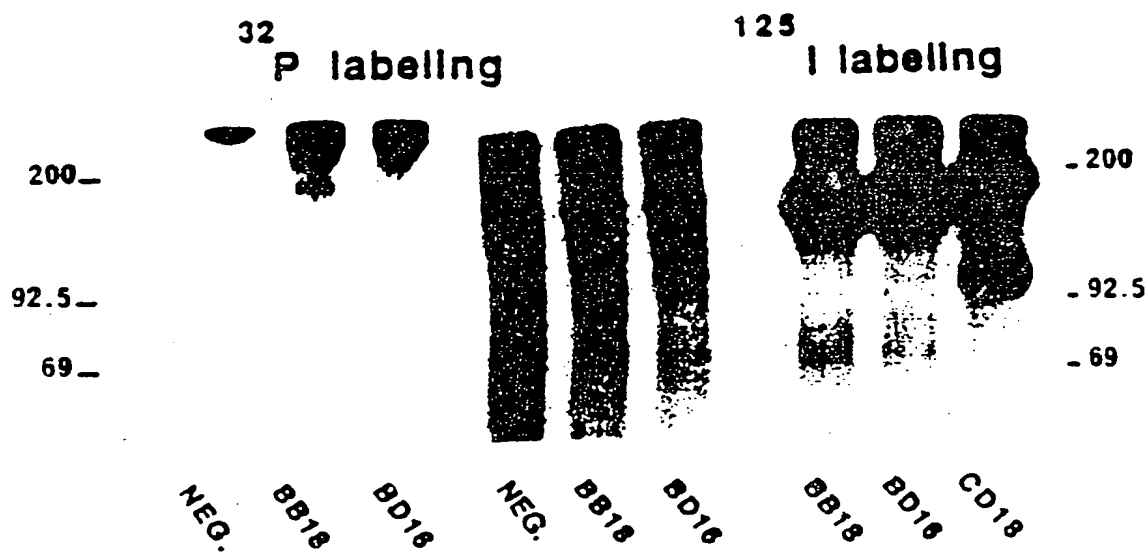
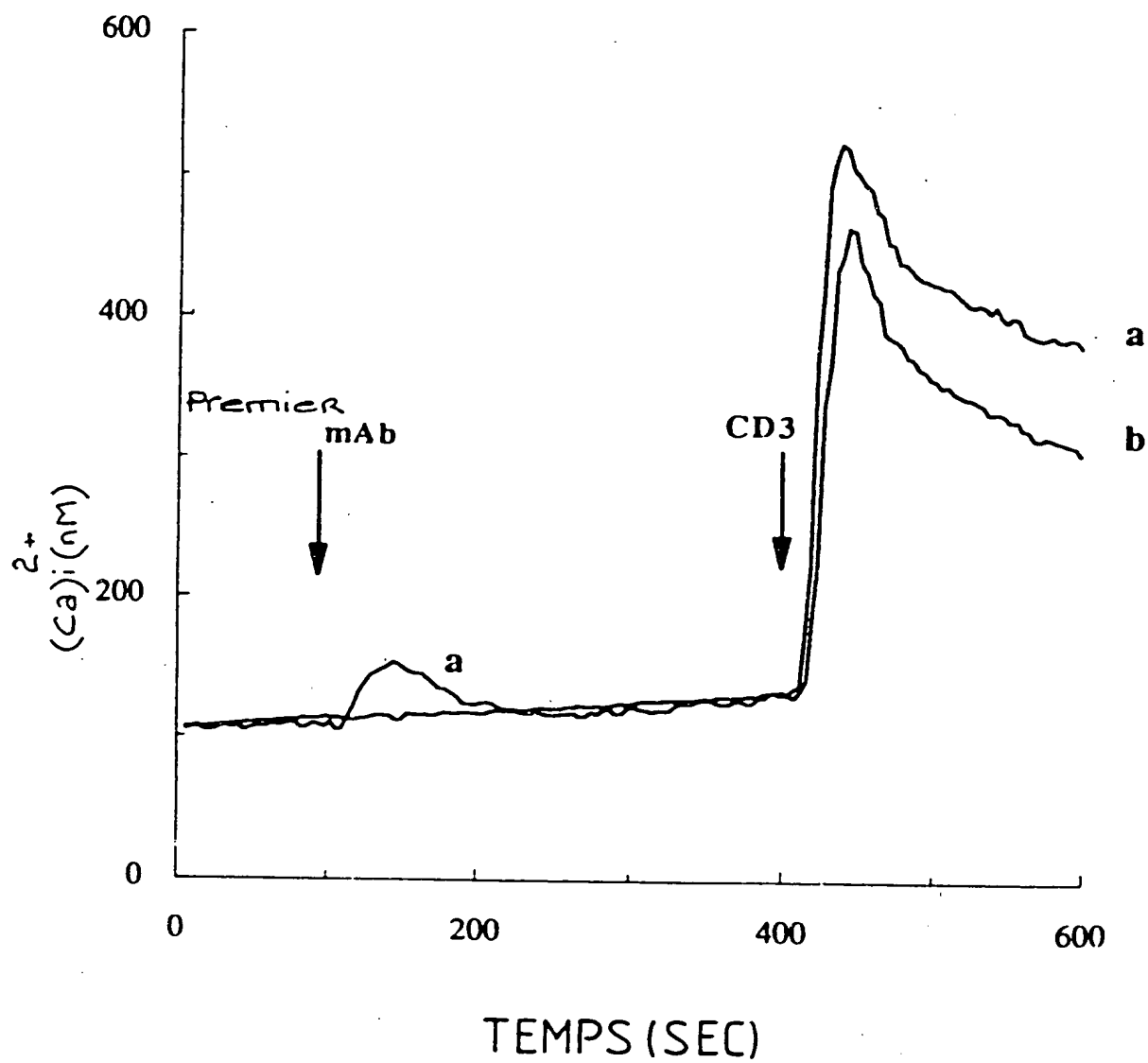


FIG. 11

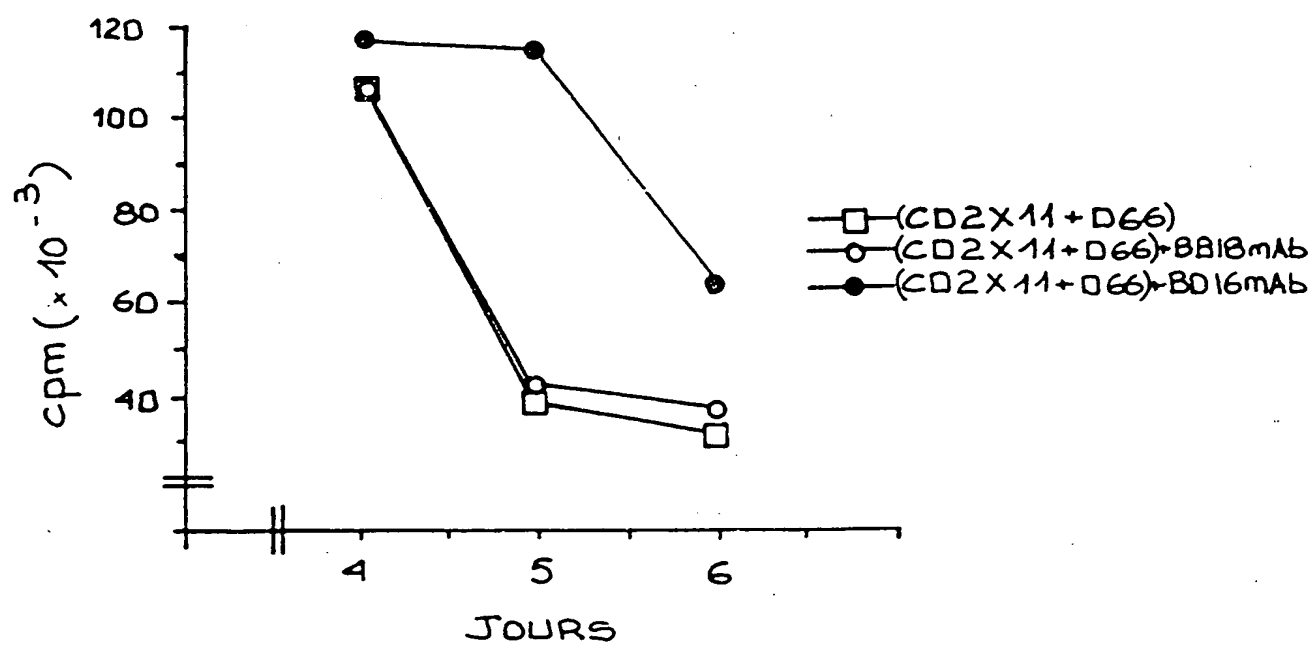
15/16

FIG 12

93243153

REPLACEMENT

16/16

FIG_13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ : C07K 15/14; C12P 21/08; C12N 5/20; G01N 33/577
 A61K 37/02; A61K 39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ : C07K; C12P; C12N; G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | DE, A, 3 942 579 (BASF AG) 27 June 1991, see the whole document | 1-19 |
| P, X | --- THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY Vol. 148, No.2, 15 January 1992, BALTIMORE MD US pages 318-323 C. BOUGERET ET AL. 'Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation' see the whole document ----- | 1-8, 10, 14-19 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 1993 (20.04.93)

Date of mailing of the international search report

14 May 1993 (14.05.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile N .

Authorized Officer

Telephone No.

FR 9300025
SA 69613

20/04/93

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE-A-3942579 | 27-06-91 | WO-A- 9109873 | 11-07-91 |
| ----- | | | |

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

93243153

| | | |
|---|--|---|
| I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷ | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| CIB 5 C07K15/14; A61K37/02; | C12P21/08; A61K39/395 | C12N5/20; G01N33/577 |
| II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE | | |
| Documentation minimale consultée ⁸ | | |
| Système de classification | Symboles de classification | |
| CIB 5 | C07K ; C12P ; C12N ; G01N A61K | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰ | | |
| Catégorie ⁹ | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³ | No. des revendications visées ¹⁴ |
| A | DE, A, 3 942 579 (BASF AG) 27 Juin 1991 voir le document en entier | 1-19 |
| P, X | THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 148, no. 2, 15 Janvier 1992, BALTIMORE MD, US pages 318 - 323 C. BOUGERET ET AL. 'Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation.' voir le document en entier | 1-8, 10, 14-19 |
| <p>⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale | |
| 20 AVRIL 1993 | 14. 05. 93 | |
| Administration chargée de la recherche internationale | Signature du fonctionnaire autorisé | |
| OFFICE EUROPEEN DES BREVETS | NOOIJ F.J.M. | |

FR 9300025
SA 69613

20/04/93

EPO FORM 00472

93243153